

96

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Emile COUTURE

*Docteur en Médecine*

*Pharmacien de 1<sup>re</sup> Classe*

*Préparateur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

---

1<sup>re</sup> THÈSE

Contribution à l'étude des Stérols

Leur action photochimique et leur pouvoir d'oxydation

2<sup>e</sup> THÈSE

Propositions données par la Faculté

---

*Soutenues en juin, devant la Commission d'examen*

MM. CARDOT, *Président*

HUGOUNENQ

BEAUVÉRIE

FROMAGEOT

---

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE  
DE L'UNIVERSITÉ

---

1930







Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41553621\\_0070](https://archive.org/details/IA41553621_0070)

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES STÉROLS



# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

PAR

Emile COUTURE

*Docteur en Médecine*

*Pharmacien de 1<sup>re</sup> Classe*

*Préparateur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon*

---

1<sup>re</sup> THÈSE

Contribution à l'étude des Stéroïds

Leur action photochimique et leur pouvoir d'oxydation

2<sup>e</sup> THÈSE

Propositions données par la Faculté

---

*Soutenues en juin, devant la Commission d'examen*

MM. CARDOT, *Président*

HUGOUNENQ

BEAUVÉRIE

FROMAGEOT

---

LYON

EDITIONS DU SERVICE PHOTOGRAPHIQUE  
DE L'UNIVERSITÉ

---

1930

# UNIVERSITÉ DE LYON — FACULTÉ DES SCIENCES

## Doyen :

M. GRIGNARD, O.  I. , P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

## Assesseur :

M. VANEY,  I. .

## Professeurs honoraires :

MM. VESSIOT, O.  I.;

GÉRARD, O.  I.  C; RIGOLLOT,  I.;

VAUTIER,  I.; LE VASSEUR,  I.;

OFFRET,  I. .

COUTURIER,  I. .

## Professeurs titulaires :

MM. GRIGNARD, O.  I. , P. N., Membre de l'Institut, Chimie générale.

KOEHLER, O.  I. , Correspondant de l'Institut, Zoologie.

DULAC,  I. , Calcul différentiel et intégral.

MASCART,  I. , Astronomie physique.

SIRE,  I. , Mécanique rationnelle et appliquée.

MEUNIER,  I. , Chimie industrielle.

BEAUVÉRIE,  I. , Botanique.

THOVERT,  I. , Physique.

CARDOT,  I. , Physiologie générale et comparée.

VANEY,  I. , Zoologie.

LONGCHAMON,  I. , Minéralogie théorique et appliquée.

LOQUIN,  I. , Chimie générale.

ROMAN,  I. , Géologie.

## Professeurs titulaires (sans chaire) :

MM. DOUIN, , Botanique.

DEJARDIN, , Physique.

LEMARCHANDS,  I. , Chimie industrielle.

EYRAUD, , Mathématiques.

## Maîtres de Conférences et Chargés de Cours complémentaires :

MM. AUMÉRAS, Chimie physique.

FROMAGEOT, Chimie agricole.

BONNET,  I. , Zoologie appliquée et Zootechnie.

MAYET,  I. , Anthropologie.

PELOSSE,  I. , Sériciculture.

DONCIEUX,  I. , P. C. N. supérieur.

SEYEWETZ,  I. , Matières colorantes artificielles.

M<sup>lle</sup> BACHRACH,  I. , Physiologie.

## Secrétaire :

M<sup>me</sup> NÉTIEU, .

MEIS ET AMICIS.



## INTRODUCTION

La notion de cholestérine, déchet cellulaire, classique il y a encore quelques années, a fait place, à la faveur des nombreux travaux dont ce corps a été l'objet, à une interprétation beaucoup plus large des fonctions qui lui sont dévolues. Le cholestérol se rencontre partout. Il n'est probablement pas de cellule qui en soit dépourvue. Une telle universalité ne pouvait pas être fortuite, et c'est ce caractère qui a, sur ce corps, attiré l'attention des chercheurs. Il est vite apparu que le cholestérol jouait un rôle de premier plan dans les phénomènes biochimiques et qu'il subissait lui-même au cours du métabolisme, des transformations importantes. Ce n'était donc pas une molécule morte, que sa présence dans les concrétions biliaires, l'arc sénile des vieillards, les squames de psoriasis, certains liquides pathologiques, avait pu faire considérer comme un déchet dont l'organisme se débarrassait.

Néanmoins, cette notion semble demeurer juste pour les formations pathologiques où le cholestérol que l'on y rencontre pourrait bien être une forme stable parvenue au terme de ses transformations. La constance de ses caractères physiques, ses for-

mes cristallines, sa faible aptitude réactionnelle, permettent de considérer le cholestérol des concrétions et des liquides pathologiques comme une molécule à bout de course.

D'ailleurs la résistance extraordinaire du cholestérol nous est suffisamment prouvée par ce fait qu'on en a trouvé dans le pétrole ; ce qui constitue, en même temps qu'un argument en faveur de l'origine biologique du pétrole, la preuve que le cholestérol a pu résister mieux que toute autre substance organique complexe, à l'influence des cataclysmes géologiques.

Mais avant d'atteindre cet état de stabilité, quel a bien pu être le sort de cette molécule si complexe, si labile ? Et d'abord, est-ce bien la cholestérine, ou pour mieux dire, le cholestérol qu'il faut envisager en tant qu'entité bien définie ? La découverte de ce corps dans les calculs biliaires revient à Conradi en 1775, mais, c'est Chevreul qui, en 1818, le reconnut pour une substance distincte et lui donna le nom de cholestérine. Il fut par la suite isolé successivement de la bile de l'homme et des animaux par Chevreul ; du cerveau, par Couerbe, du sang par Denis, Boudet, Le Canu ; du jaune d'œuf, par Copley. On l'a retrouvé depuis, dans tous les tissus et dans tous les liquides de l'organisme où il existe à l'état libre ou combiné aux acides gras supérieurs, sous forme d'éthers oléique, stéarique, palmitique. Dans le règne végétal, c'est C. Tanret qui, en 1889, réussit le premier à isoler à partir de l'ergot de seigle un corps cristallisé dont il décrivit les propriétés

physiques et chimiques et qui s'apparentait au cholestérol. Gérard, en 1897, obtenait ce même corps en prenant comme matière première des champignons appartenant à diverses familles : basidiomycètes, ascomycètes et lichens. C'est encore cet auteur qui réussit à isoler ce même corps de la levure de bière. Mais la question se complique du fait que C. Tanret trouve dans l'ergot, à côté de ce premier corps, un second corps bien caractérisé et que, dans la levure, Mrs Smedley Mac Lean, tout récemment, est parvenue à isoler un troisième corps différent des deux autres. Le terme de cholestérine était donc trop étroit, et la ressemblance qui frappait au premier abord entre tous ces corps ne résistait pas à une analyse plus approfondie. On a cherché à situer le cholestérol dans la classification, le rangant d'abord dans la classe des lipoides. Abderhalden l'en a exclu et en a formé une classe spéciale, sous le nom de stérols. Ce groupe est venu prendre place auprès des autres groupes biologiques, et son importance chaque jour grandissante le placera peut-être sans tarder sur un pied d'égalité avec les protides, les lipides et les glucides. Une étude plus approfondie n'a pas tardé à montrer qu'il existe des divergences de constitution, d'abord suivant le règne auquel appartiennent les stérols et, dans un même règne, suivant leur origine. On a donc divisé cette classe en deux sous-groupes : les zoostérols et les phytostérols.

A n'examiner que leur formule brute, il semble que ces corps aient entre eux une grande ressem-

blance, mais les travaux récents, tendant à établir la formule de constitution des phytostérols, ont bien prouvé qu'il y avait entre ces corps, non pas une simple isomérisie, bien que la formule permette un nombre incalculable d'isomères, mais une différence profonde de structure ; tandis que, par exemple, les zoostérols ne présentent qu'une liaison éthylénique cyclique, les phytostérols, ou tout au moins certains d'entre eux, en ont trois ou quatre, dont une au moins sur une chaîne latérale. Toutes les constantes physiques et la plupart des réactions leur sont spéciales, et ces caractères différentiels entraînent des propriétés très diverses et en particulier une activité réactionnelle qui est particulièrement marquée chez les stérols d'origine végétale en comparaison de celle des zoostérols. On rencontre bien certains cholestérols dont l'action biologique semble plus intense que chez certains autres, mais on en vient à se demander si ces propriétés ressortissent bien à la molécule cholestérol ou à des traces de phytostérols l'accompagnant sans qu'on puisse les séparer par des cristallisations aussi soigneuses que possible, ces corps ayant les mêmes solubilités dans des solvants identiques.

Quel est donc le cycle des stérols ? D'où viennent-ils, où se forment-ils, comment se transforment-ils, où vont-ils ? Autant de questions auxquelles on ne peut répondre encore que par des probabilités. Pour les uns, l'organisme animal serait capable de créer de toutes pièces l'édifice moléculaire du cholestérol. Celui-ci pourrait donc être en partie d'origine en-

dogène. Ce rôle serait dévolu aux capsules surrénales, aux corps jaunes et à l'ovaire. La synthèse se ferait aux dépens de l'acide oléique par oxydation de la trioléine.

Il serait bien exceptionnel à la vérité que les organismes supérieurs soient capables d'édifier une molécule aussi complexe quand ils ne peuvent pas réaliser la synthèse du noyau aromatique et, à fortiori, celle des alcaloïdes, des porphyrines, des terpènes et même d'édifices plus simples, comme les glucides. Ces synthèses restent l'apanage des plantes.

L'autre opinion, à laquelle nous nous rangeons, est celle du cholestérol introduit dans l'organisme à la faveur de l'alimentation, donc d'origine exogène.

L'hypothèse est la suivante: au cours de l'ingestion des aliments d'origine végétale, ou de la chair des animaux herbivores, le cholestérol est introduit dans l'organisme. Si ce cholestérol n'est jamais éliminé sous la forme qu'il revêt dans les plantes, mais bien sous la forme cholestérol, ou coprostérol, son dérivé hydrogéné, c'est que l'organisme est capable de transformer les phytostérols en zoostérols.

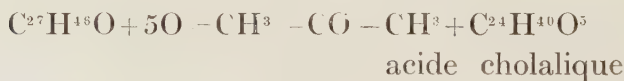
Selon toute vraisemblance, il y a là un processus biologique naturel, un cycle de transformation. Les plantes emprunteraient au sol, du cholestérol brut (agrostérol), résultant de l'action des microorganismes contenus dans ce sol, ou bien avec l'aide de l'énergie solaire, elles en feraient la synthèse à l'état de phytostérol qui, à son tour, après sa pénétration dans l'organisme animal, devient le cholestérol dont

une part est utilisée, transformée, et l'autre part éliminée sous forme de cholestérol déchet ou de coprosterol. Si l'on ne connaît à l'heure actuelle rien de précis sur la véritable origine du cholestérol, on commence à entrevoir quelques-unes de ses transformations. Nous verrons au chapitre suivant où en est actuellement l'état de la question.

Depuis 1907, Lifschütz, de Hambourg, a poursuivi l'étude des transformations subies par la molécule cholestérique, et il a démontré dans une suite d'intéressants mémoires que le procès d'oxydation du cholestérol s'opère d'abord dans le sang, puis dans le foie, et que cette oxydation irait dans cet organe jusqu'aux acides biliaires.

Ces recherches poursuivies par l'école de Chauffard et en particulier par Grigaut ont permis à cet auteur, dès 1913, de reconnaître à la glande hépatique le pouvoir de transformer le cholestérol en acide cholalique.

Les travaux de Windans, de Wieland et de leurs collaborateurs sont venus depuis apporter la confirmation éclatante de cette théorie, en montrant la possibilité chimique du passage du cholestérol à l'acide cholalique par voie d'oxydation selon l'équation :



Les transformations du cholestérol dans l'organisme vivant sont donc indéniables et à ces trans-

formations doivent correspondre des fonctions de même importance. Jusqu'à ces dernières années on attribuait au cholestérol, comme seules fonctions, un rôle de défense comme antihémolytique et antitoxique. L'expérience classique de Morgenroth et Reichert l'avait démontré de façon absolue ; Chauffard et Grigaut ont constaté qu'au cours de certaines maladies infectieuses aiguës, la quantité de cholestérol contenue dans le sérum sanguin diminue, ce qui est dû au pouvoir de ce corps de se combiner avec les toxines. Dans la convalescence, la cholestérolémie revient à la normale. Il est admis aujourd'hui, depuis les travaux de Wright, que la phagocytose s'exerce surtout grâce à l'action du cholestérol contenu en abondance dans la partie périphérique des leucocytes. Ce même auteur a démontré que l'hémolyse des hématies par les savons est empêchée par le cholestérol. Il se fait une combinaison entre ce corps et l'oléate de soude, sous forme d'un oléate de cholestéryl dépourvu d'action nocive. Et ce mécanisme, d'après Lemoine, pourrait expliquer l'action de la paratoxine, riche en cholestérol, sur l'augmentation du nombre des globules rouges. Il nous suffira de rappeler les travaux d'Overton, sur l'équilibre de la perméabilité cellulaire et le rôle qu'on attribue au cholestérol dans ce mécanisme. On sait le parti qu'en a tiré cet auteur pour son interprétation des phénomènes anesthésiques. Enfin, le caractère d'hydrophilie du cholestérol a permis d'édifier sur son rôle un certain nombre d'hypothèses.

Tandis que les éthers du cholestérol n'absorbent pas d'eau, ce corps à l'état libre peut en fixer des quantités qui varient de 30 à 500 fois son poids. Cette constatation conduit Minovici à soutenir que, si le cerveau contient une si grande quantité d'eau, il faut attribuer ce fait à la présence dans cet organe d'une grande quantité de cholestérol qui doit y être à l'état libre. Et cet auteur attribue à ce corps un rôle d'isolant et de protecteur de la matière nerveuse comparable à celui des terpènes pour le courant électrique. Or, le cholestérol et les terpènes possèdent quelques degrés de similitude chimique. Mais ce sont les travaux récents de l'école américaine et en particulier de Mellamby, Mac Collum, Simmonds, Steenbock, Papenheimer, Rosenheim et Webster, pour ne citer que les principaux, qui sont venus éclairer d'un jour nouveau les recherches sur les fonctions dévolues aux stérols.

Mellamby en 1919-1921, a réussi à composer des régimes alimentaires qui déterminent à coup sûr chez le chien une affection cliniquement semblable au rachitisme spontané assez fréquent dans cette espèce. Par l'étude systématique du rachitisme expérimental, on est arrivé à en saisir la pathogénie et à en établir la thérapeutique rationnelle. Le rôle des stérols dans cette affection est apparu primordial. Par une merveilleuse convergence, les chercheurs du monde entier sont arrivés à établir l'importance de ces corps et le mécanisme de leur action et du même coup s'est éclairé d'un jour nouveau le mécanisme de l'action thérapeutique de l'huile de

foie de morue, vieux médicament resté jusque-là dans le domaine de la pratique empirique. Guidés par l'expérimentation physiologique, il apparut que la valeur antirachitique de cette huile était toute dans son insaponifiable et en particulier dans son cholestérol, et que celui-ci acquérait par irradiation une propriété thérapeutique plus marquée. Rosenheim et Webster, en étudiant systématiquement l'activabilité d'un certain nombre de stérols, d'origine animale et végétale, eurent la bonne fortune de trouver dans l'ergostérol une substance mère de la vitamine antirachitique, d'une activité mille fois plus grande que celle du cholestérol, résultats confirmés en même temps par Hess en Amérique et Windaus en Allemagne. Ce fait remarquable était donc, en quelques mois, établi de façon incontestable, mais quel peut en être le mécanisme chimique ? Comment l'activation modifie-t-elle la molécule des stérols au point d'intensifier ainsi leur action ?

Un problème aussi vaste, portant sur une molécule aussi complexe, ne peut-être résolu que par des recherches, dont le temps seul est le maître. La diversité des travaux, leur multiplicité permettra à la solution précise du problème, d'intervenir.

Nous n'avons pas la prétention d'apporter ici une contribution de quelque valeur à l'étude des stérols. Nous serons trop heureux si nous avons pu, par notre modeste contribution, éclairer de quelque lumière, si faible soit-elle, un des côtés de leur action. L'idée de ce travail revient toute entière à notre

maître le Professeur Hugounenq, l'exécution en a été poursuivie pendant plusieurs années dans son laboratoire. Des travaux antérieurs sur l'effet photochimique des stérols nous ont incité, étant donné leur divergence, à tâcher d'en saisir le mécanisme et d'en fournir une interprétation. Ces recherches et les résultats que nous avons obtenus nous ont amené à penser que les stérols pourraient bien, sous certaines conditions, jouer le rôle d'autoxydateurs.

Nous avons donc dans une autre partie de ce travail exposé les résultats de nos recherches dans cette voie. L'étude de ces phénomènes, portant particulièrement sur les huiles, nous a permis d'étudier l'oxydation de l'huile de foie de morue, et les observations que nous avons pu faire nous ont incité à tâcher d'élucider le mécanisme chimique de l'action thérapeutique de cette huile. C'est le dernier chapitre de notre travail.

M. le Professeur Cardot a bien voulu accepter d'être le rapporteur de notre thèse, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre gratitude et nos plus vifs remerciements.

Pendant huit années consécutives, nous avons eu le grand honneur d'être l'assistant de M. le professeur Hugounenq, doyen honoraire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie. Cette collaboration dans l'intimité du laboratoire restera comme la marque d'une empreinte indélébile. Puisse la technique rigoureuse, la logique impeccable qui ont été la plus pure émanation de sa fréquentation journalière, être pour notre avenir un guide indéfectible.

Qu'il nous soit permis d'évoquer les heures radieuses où, en collaboration avec le Professeur agrégé Florence, nous secondions notre Maître de toutes nos forces et de tout notre enthousiasme. Nous avons, dans cette ambiance, apprécié le prix de la recherche et toute la joie de connaître, la valeur de cette vérité scientifique, dont la parcimonieuse dispense fait justement la grandeur. Que notre Maître veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance infinie et de notre profonde vénération,

M. le Professeur Morel a bien voulu nous témoigner les marques de l'intérêt qu'il nous porte. Il nous a prodigué, avec son obligeance coutumière, les conseils et les encouragements dont nous avons besoin, qu'il accepte le témoignage de notre gratitude la plus vive et tous nos remerciements. Nous avons trouvé auprès de M. le Professeur Leulier tous les conseils éclairés et les encouragements qu'il nous a dispensés avec la plus parfaite affabilité. M. le Professeur Mouriquand a bien voulu mettre à notre disposition son chenil et son laboratoire, afin de nous permettre de poursuivre notre expérimentation physiologique. Nous lui en sommes particulièrement reconnaissant et le prions d'accepter nos bien vifs remerciements.

Et ce serait une preuve d'ingratitude, mon cher Velluz, que de ne pas rappeler ici tous les services que je dois à votre chère amitié.



## CHAPITRE PREMIER

### LE CHOLESTÉROL ET SES DÉRIVÉS

Le cholestérol a pour formule brute  $C^{27}H^{46}O$ .

Les premières analyses faites par Berthelot avaient conduit à la formule  $C^{26}H^{44}O$ . Par l'analyse des dérivés halogénés Keinitzer avait trouvé la formule  $C^{27}H^{46}O$ . Pregl et Lieb la confirmèrent. Windaus dans ses travaux avait utilisé la formule  $C^{27}H^{44}O$  jusqu'en 1909 ; c'est cette formule qu'on rencontre jusqu'à cette date dans la littérature et qui doit être augmentée de deux atomes d'hydrogène.

#### I. LA FORMULE DE WINDAUS.

1° Berthelot, en 1856, obtint un éther de la cholestérine, ce qui montre que ce corps possède une fonction alcool. En 1904, Diels et Abderhalden, par oxydation de cette fonction, obtinrent une cétone, puis un diacide, ce qui permet d'affirmer que la cholestérine possède une fonction alcool secondaire intracyclique.

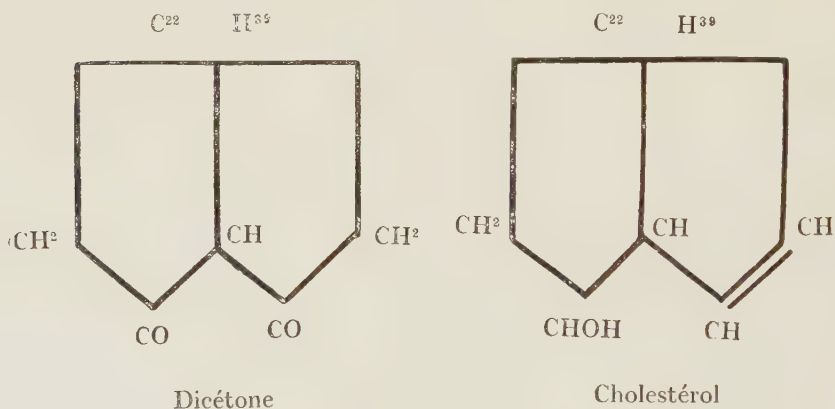
2° Wislicenus et Moldenhauer, en 1868, remarquèrent l'aptitude particulière de la cholestérine à fixer deux atomes de brôme et en conclurent à la

présence d'une liaison éthylénique dans sa molécule. Windaus put définir la position de cette double liaison.

a) Si on oxyde cette fonction éthylénique tout en préservant la fonction alcoolique, on aboutit à un diacide-alcool. La double liaison appartient donc comme l'oxydrile à un cycle.

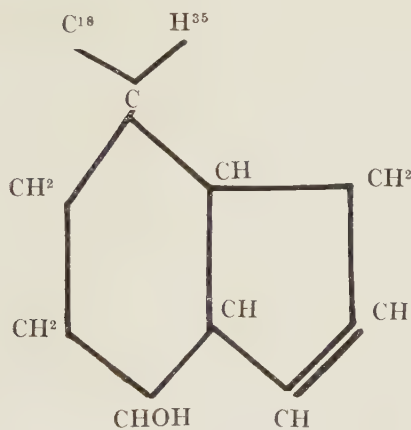
b) Si on oxyde les deux fonctions alcoolique et éthylénique, on aboutit à un acide tétracarbonique et perte de chaînes carbonées, ce qui montre que les deux cycles sont différents.

c) Enfin, si l'on transforme les deux fonctions éthylénique et alcoolique en fonction cétone, on démontre que ces deux fonctions sont l'une par rapport à l'autre en position  $\gamma$ , ce qui conduit à figurer ainsi la portion déjà connue de la molécule cholestérique

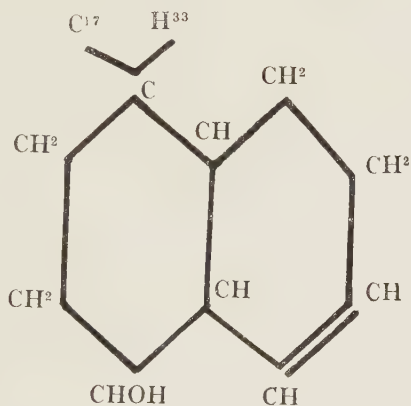


30 Windaus et Dalmat ont montré encore que si l'on transforme la fonction alcoolique en deux fonctions, le diacide formé d'après la méthode de Blanc

et Ascham peut être considéré comme possédant six atomes de carbone, ce qui laisse penser que le cycle hydrolysé est un cycle hexatomique. La même méthode a permis d'attribuer cinq atomes de carbone à la chaîne possédant la double liaison. Il en faudrait conclure que la cholestérine renferme un noyau indolique. Cette dernière opinion n'est point admise par Diels et Abderhalden qui pensent qu'il s'agit au contraire d'un noyau naphthalénique. La représentation de ces résultats donne donc les formules :



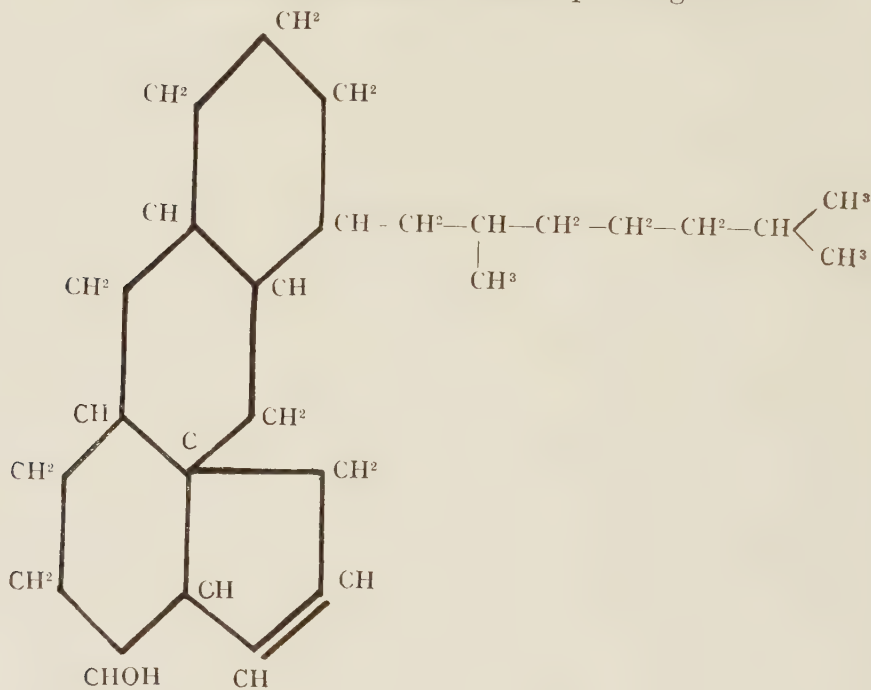
Formule de Windaus



Formule de Diels et Abderhalden

4° L'hydrogénation complète de la cholestérine fournit un carbure saturé, le cholestane  $C^{27}H^{58}$ , auquel il manque huit atomes d'hydrogène pour correspondre à la formule des carbures aliphatiques saturés  $C^nH^{2n+2}$ , soit  $C^{27}H^{56}$ , ceci suppose donc l'existence dans la molécule de quatre chaînes cycliques.

5° Enfin Windaus et Resan, par oxydation éner-  
gique du cholestérol, ont montré l'existence d'une  
chaîne latérale à huit atomes de carbone; au total  
on obtient le schéma de Windaus qui se figure ainsi:



Cholestérol.

Formule de Windaus

## 2. LES PRODUITS D'OXYDATION.

La théorie classique qui montrait la cholestérine,  
molécule de déchet, traversant l'organisme sans su-  
bir de modification, semble aujourd'hui céder le pas.

à une conception neuve due à Lifschütz qui montre la cholestérine s'oxydant lentement dans le sang et aboutissant peu à peu aux sels biliaires.

1° *Les travaux de Lifschütz :*

Lifschütz a montré qu'il existe dans le sang, non de la cholestérine, mais divers stérols qu'il faut distinguer les uns des autres.

a) Si l'on traite la cholestérine par des oxydants légers, tels que les rayons ultra-violets, ou plus simplement la lumière solaire, elle change de propriétés physiques ; son point de fusion s'abaisse ; ses cristaux changent d'aspect. Ceux de la cholestérine sont des cristaux monocliniques formant des tables avec des angles de  $79^{\circ}30'$  et de  $100^{\circ}3'$ , montrant une direction des arêtes nettes et des angles de  $\frac{34^{\circ}}{56}$  et de  $\frac{44^{\circ}05'}{44,5}$ , ceux de la cholestérine

irradiée sont des cristaux elliptiques à arêtes courbes, s'agglomérant en rosaces ; enfin, elle fixe jusqu'à 500 % d'eau, alors que la cholestérine de calcul n'en fixe que 30 %. Un tel corps est dénommé : métacholestérine. Cet auteur ne lui attribue aucune formule nouvelle pour le caractériser.

b) Une oxydation plus poussée au peroxyde de benzoyle conduit à l'obtention d'un certain nombre de composés d'oxydation, composés qui forment une huile et non des corps cristallisés et qui ont en commun une réaction décrite par Lifschütz.

Si l'on ajoute à une solution chloroformique d'oxycholestérine quelques centimètres cubes d'un réactif constitué de neuf parties d'acide acétique cristallisable et d'une partie d'acide sulfurique concentré et pur, on voit apparaître une teinte violet rose qui vire au vert si l'on ajoute quelques gouttes de perchlorure de fer.

A ces composés, Lifschütz attribue les formules :



Une oxydation plus poussée aboutit à des corps voisins de l'acide cholanique, ne donnant ni réaction de Liebermann, ni réaction de Lifschütz.

c) Ainsi, l'on saisit d'après l'œuvre de Lifschütz, toute une évolution possible de la cholestérine.

Le sang renferme de la métacholestérine, puis de l'oxycholestérine qui s'oxydant, au niveau du foie, donne les acides biliaires.

La cholestérine des calculs ne subit pas de semblables transformations. Ainsi donc s'oppose les deux molécules de cholestérine. La cholestérine du sang ou métacholestérine et la cholestérine classique des calculs, stable, semblant bien une molécule excrémentitielle.

## L'ORIGINE DES ACIDES BILIAIRES

Les acides biliaires semblent provenir de la cholestérine. Celle-ci par réduction et isomérisation se transforme en pseudo-cholestérine qui par oxyda-

tion aboutit à l'acide cholanique. Cet acide par oxydation fournit les principaux acides biliaires.

Nous connaissons déjà la formule de la cholestérine, il nous reste à étudier celle des acides biliaires, tout en examinant les modes de passage possible du cholestérol aux acides biliaires.

### 1<sup>o</sup> *Le coprostérol :*

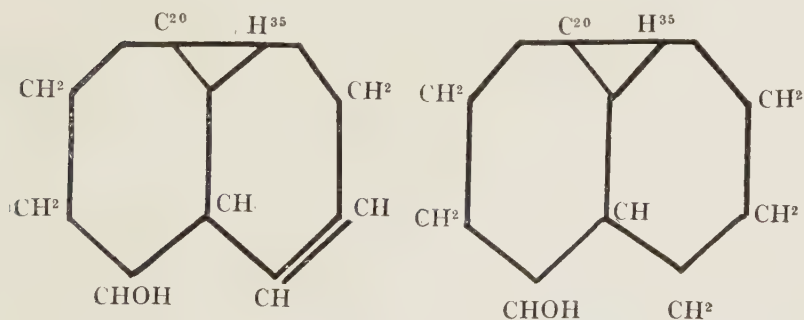
Les trois acides biliaires conduisent par réduction au même acide: *l'acide cholanique* de formule:  $C^{24}H^{40}O^2$ , dont il faut d'abord connaître la constitution.

a) En 1862, Flint a isolé, des matières fécales, un corps qui fut plus tard appelé coprostérol.

Le coprostérol est bien connu depuis les travaux de Windaus. Sa formule de constitution ne diffère de celle du cholestérol que par deux particularités :

— Elle ne possède pas de double liaison et par conséquent compte 2 hydrogènes en plus de celle du cholestérol.

— Elle présente comme stéréo-isomère du cho-



Cholestérol..

Coprostérol

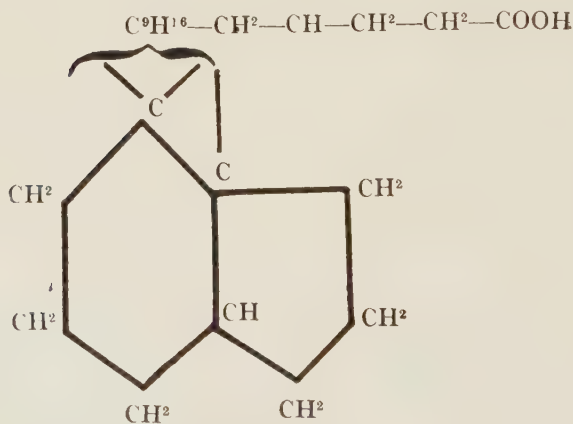
lestérol, le carbone asymétrique, siège de l'isomé-  
rie, étant figuré ainsi que le montrent les deux formules  
ci-devant :

2° *L'acide cholalique.*

Il reste au coprostérol les cycles, la chaîne laté-  
rale et la fonction alcool du cholestérol. En le satu-  
rant, on aboutit par suppression de cette fonction  
alcool à un carbure saturé, le pseudo-cholestane.  
Or, le pseudo-cholestane traité par l'anhydride  
chromique rompt sa chaîne latérale et donne de  
l'acide cholanique.

L'acide cholanique peut donc être obtenu depuis  
le cholestérol par une isomérisation, puis par réduc-  
tion qui fait disparaître les deux fonctions alcool-  
iques et éthyléniques et enfin par perte de la chaîne  
latérale.

L'acide cholanique dès lors possède la formule :



Acide cholanique

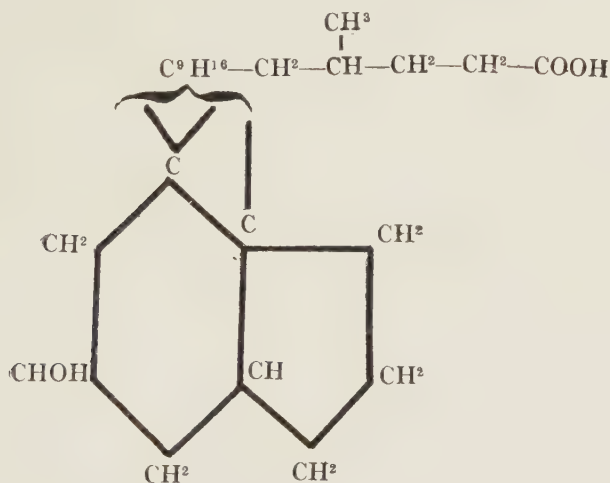
Les acides biliaires connus sont au nombre de trois, ce sont :

— L'acide lithocholique, l'acide désoxycholique et l'acide cholalique. Tous trois dérivent de l'acide cholanique par substitution de 1, 2 ou 3 oxhydriles à des hydrogènes de la molécule, on a donc :

ac. cholalique :  $C^{26}H^{33}(CHOH)^3COOH$ . ac. trioxycholanique.  
 ac. dioxycholique :  $C^{21}H^{35}(CHOH)^2COOH$  ac. dioxycholanique.  
 ac. lithocholique :  $C^{22}H^{37}(CHOH)COOH$ , ac. monoxycholanique.

Ainsi, les trois acides ont un hydroxyle commun.

Wieland fixe le carbone 3 de la chaîne I, de l'acide cholanique, ce qui donne pour l'acide lithocholique la formule :

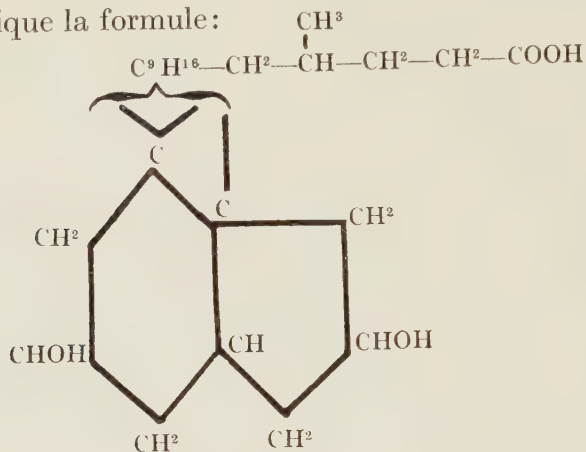


Acide lithocholique

(Ac. monoxycholanique)

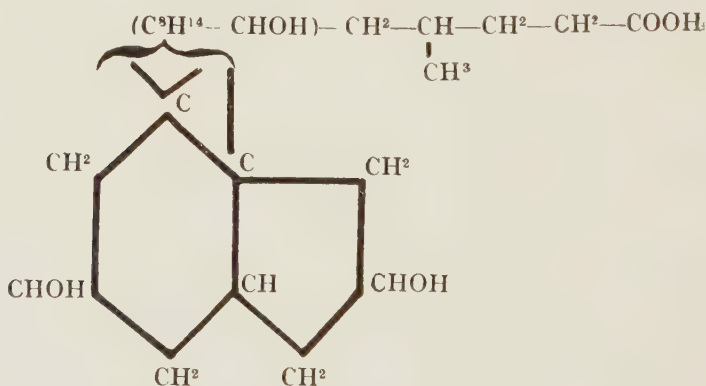
Le second hydroxyle qui se trouve dans l'acide cholalique et dans l'acide dioxycholique appartient à la chaîne II où d'après Wieland il est fixé à l'ato-

me de carbone 7, ce qui donne pour l'acide dioxy-  
chologique la formule:



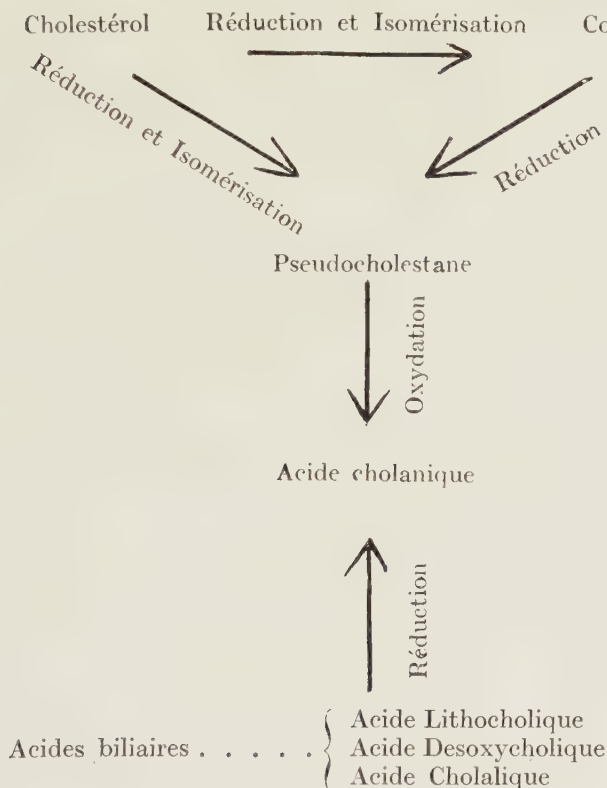
Acide desoxychologique  
(Ac. dioxycholanique)

Enfin le troisième hydroxyle qui se trouve dans  
l'acide cholalique appartient probablement à une  
chaîne fermée du groupe médian  $\text{C}^9\text{H}^{16}$ , ce qui  
donne pour cet acide, la formule:



Acide cholalique  
(Ac. trioxycholanique)

Cette filiation a peu près assurée peut être représentée d'après un schéma très simple dû à Grigaut :



Lifschütz a signalé une réaction commune au cholestérol et à l'acide cholalique :

Si l'on prend une solution de cholestérol dans l'acide acétique cristallisable, à laquelle on ajoute environ 0 gr. 25 de peroxyde de benzoyle et qu'on fasse bouillir le mélange à trois reprises pendant une minute chaque fois, en refroidissant dans chaque intervalle, si on ajoute alors environ 1 centimè-

tre cube d'acide sulfurique concentré et pur, goutte à goutte, on voit se former une très belle coloration bleue qui s'intensifie peu à peu.

A partir de l'acide cholalique au lieu du cholestérol et dans les mêmes conditions, on obtient la même coloration.

Depuis la découverte de l'action des stérols irradiés dans le traitement du rachitisme, l'étude des effets de l'irradiation, tant au point de vue physique et chimique qu'au point de vue biologique a été poursuivie, mais c'est surtout pour l'ergostérol qu'elle a été réalisée de façon systématique. Le problème du rachitisme étant un problème biologique, il ne peut être résolu en dernière analyse que par l'expérimentation physiologique. Il ne semble pas qu'on puisse, à l'heure actuelle, tirer des conclusions concernant l'activité biologique d'un produit d'irradiation sur la seule base des modifications physiques ou chimiques qu'il présente.

On connaît actuellement quelques-unes des modifications apportées par l'irradiation à la molécule des stérols. A la suite des recherches de Pohl (1926) sur les spectres d'absorption de ces corps, Windaus et Hess, Rosenheim et Webster étudièrent le remarquable pouvoir d'absorption de l'ergostérol.

Le spectre d'absorption de l'ergostérol avant irradiation est caractérisé par quatre bandes situées respectivement à 2940, 2820, 2710 et 2600 U. Å., la seconde et la troisième présentant une forte densité optique. Une irradiation prolongée amène l'affaiblissement progressif de la deuxième et de la troi-

sième bande, puis leur effacement. Mais la quatrième bande, 2600 U. Å., subsiste et du côté des petites longueurs d'onde, la courbe d'absorption s'élève avec la durée des irradiations, la zone d'absorption se trouvant ainsi déplacée vers la région des courtes longueurs d'onde.

Un autre caractère différentiel est la différence entre la précipitation de l'ergostérol par le digitonoseide avant et après irradiation. Tandis que ce corps à l'état initial précipite entièrement par une solution alcoolique de digitonine, en donnant un complexe d'où il est possible de régénérer l'ergostérol, au contraire si l'on soumet ce corps au rayonnement d'une lampe au mercure, la précipitation par le glucoside n'a plus lieu que partiellement.

Notre contribution personnelle à l'étude de ces modifications a porté sur le point de fusion et le pouvoir rotatoire avant et après irradiation ou insolation. Ce sont ces résultats que nous publions dans les tableaux ci-joints sans en tirer de conclusion du point de vue biologique.

# CONSTANTES PHYSIQUES DES DIVERS STÉROLS

Points de fusion corrigés [Tube capillaire]

| ORIGINE                              | Echantillon initial cristallisé 6 fois de l'alcool à 80° | Après demi-heure d'irradiation en solution acodique | Après insolation d'un mois sous collaphane | OBSERVATIONS                                                        |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| Calculs biliaires. . . .             | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      | Huile très ancienne dat. de 25 ans                                  |
| Huile d'œufs. . . . .                | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      |                                                                     |
| Cerveau de bœuf total                | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      |                                                                     |
| Harengs saurs. . . . .               | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      |                                                                     |
| Harengs frais . . . . .              | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      |                                                                     |
| Organes génitaux de harengs. . . . . | 148°8                                                    | 148°8                                               | 148°8                                      | Après 6 mois d'insolation (été) fond à 110° avec dégagement gazeux. |
| Sang de bœuf . . . . .               | 148°8                                                    | 132°8                                               | 122°6                                      | Dégagement gazeux.                                                  |
| Huile de foie de morue               | 145°7                                                    | 142°8                                               | se ramollit a 118°                         | Dégagement gazeux.                                                  |
|                                      |                                                          |                                                     | 128°5                                      |                                                                     |
| Moelle osseuse. . . . .              | 143°5                                                    | 135°4                                               | se ramollit vers 95°                       | Dégagement gazeux.                                                  |
|                                      |                                                          |                                                     | 130°2                                      |                                                                     |
| Papillon de Bombyx mori . . . . .    | 144°--145°                                               | 134°6                                               | se ramollit vers 90°                       |                                                                     |
|                                      |                                                          |                                                     | 120°3                                      |                                                                     |
| Escargot . . . . .                   | 145°--146°                                               | 141°7                                               | se ramollit vers 92°                       |                                                                     |
|                                      |                                                          |                                                     | 120°8                                      |                                                                     |
| Ergostérol de levure. .              | 166°8                                                    | 147°8                                               | se ramollit vers 95°                       | Dégagem. gazeux et odeur arom. de vernis chauffé.                   |
|                                      |                                                          |                                                     | 105°--107°                                 |                                                                     |
| Zymostérol . . . . .                 | 105°--107°                                               | 105°--107°                                          | 105°--107°                                 |                                                                     |
| Fongistérol . . . . .                | 143°--144°                                               | 144°                                                | 141°5                                      |                                                                     |

# POUVOIR ROTATOIRE DES DIVERS STÉROLS

Solution chloroformique. — Température 18 à 20°

| ORIGINE                                   | Echantillon initial<br>cristallisé 6 fois<br>de l'alcool à 80° | Après demi-heure<br>d'irradiation en<br>solution alcoolique | Après insolation<br>d'un mois<br>sous cellophane |                   |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------|
| Calculs biliaires. . . . .                | — 36°49                                                        | — 36°49                                                     | — 36°9                                           |                   |
| Huile d'œufs. . . . .                     | — 44°8                                                         | — 36°3                                                      | — 34°2                                           |                   |
| Cerveau de bœuf (total). .                | — 37°1                                                         | — 37°0                                                      | — 38°6                                           |                   |
| Harengs saurs. . . . .                    | — 30°9                                                         | — 27°8                                                      | — 20°5                                           |                   |
| Harengs frais. . . . .                    | — 30°8                                                         | — 28°9                                                      | — 23°2                                           |                   |
| Organes génitaux de ha-<br>rengs. . . . . | — 31°6                                                         | — 30°0                                                      | — 20°4                                           |                   |
| Sang de bœuf. . . . .                     | — 54°2                                                         | — 43°6                                                      | — 29°6                                           |                   |
| Huile de foie de morue. .                 | — 47°5                                                         | — 30°2                                                      | — 29°4                                           |                   |
| Moelle osseuse. . . . .                   | — 52°7                                                         | — 46°2                                                      | — 28°7                                           |                   |
| Papillon de Bombyx mori                   | — 45°8                                                         | — 32°6                                                      | — 27°6                                           |                   |
| Escargot. . . . .                         | — 46°7                                                         | — 30°0                                                      | — 30°0                                           |                   |
| Ergostérol de levure. . .                 | — 123°                                                         | — 80°6                                                      | — 62°9                                           |                   |
| Zymostérol. . . . .                       | + 33°2                                                         | + 33°2                                                      | + 31°9                                           | + 2% d'alc.absolu |
| Fongistérol. . . . .                      | — 22°5                                                         | — 21°9                                                      | — 20°2                                           | + 2% d'alc.absolu |

Nous avons voulu voir si l'irradiation apportait à la molécule des stérols une modification sensible au point de vue de l'analyse élémentaire. Nous avons donc fait les combustions de trois échantillons différents de stérols, le cholestérol d'huile de foie de morue, l'ergostérol de levure et le zymostérol. Les deux premiers activables par irradiation, le troisième inactivable.

Tous trois ont été purifiés jusqu'à l'obtention des.

constantes physiques admises à ce jour par les auteurs.

Une partie a été soumise en mince couche de cristaux à une irradiation de dix heures à l'air libre, à 60 centimètres de distance à l'aide d'une lampe Gallois, Type K L W, fonctionnant sous 20 volts et 5 ampères, pour courant alternatif.

*Combustion des stérols avant et après irradiation*

| Origine                                  | Avant irradiation |                                      | Après irradiation<br>de six heures | Diffé-<br>rence |
|------------------------------------------|-------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
|                                          | Trouvé            | Calculé pour<br>$C^{27}H^{46}O.H^2O$ |                                    |                 |
|                                          | —                 | —                                    |                                    |                 |
| Cholestérol d'hui-<br>le de foie de mor. | C = 81,87 %       | C = 80,19                            | C = 79,54 %                        | 2,33 %          |
|                                          | H = 11,53 %       | H = 11,8                             | H = 11,35 %                        | 0,18 %          |
|                                          | Trouvé            | Calculé pour<br>$C^{27}H^{42}OH^2O$  |                                    |                 |
|                                          | —                 | —                                    |                                    |                 |
|                                          | C = 80,11 %       | C = 81,0                             | C = 76,36 %                        | 3,75 %          |
| Ergostérol de le-<br>vure.               | H = 10,99 %       | H = 11,0                             | H = 10,37 %                        | 0,62 %          |
|                                          |                   |                                      |                                    |                 |
|                                          | Trouvé            | Formule encore<br>hypothétique       |                                    |                 |
|                                          | —                 | —                                    |                                    |                 |
|                                          | C = 76,33 %       |                                      | C = 76,30 %                        | 0,03 %          |
| Zymostérol                               | H = 12,66 %       |                                      | H = 12,44 %                        | 0,22 %          |
|                                          |                   |                                      |                                    |                 |

De ces analyses il ressort donc bien qu'une irradiation à la vérité prolongée dix heures, c'est-à-dire, bien au-delà du temps nécessaire et suffisant pour faire apparaître et disparaître la vitamine D, modifie la molécule des stérols.

Ces modifications portent sur la teneur en carbone et en hydrogène et se manifeste de façon par-

ticulièrement marquée pour les stérols doués par irradiation d'une grande activité biologique, en premier lieu pour l'ergostérol, au contraire le zymostérol dont l'action est nulle au point de vue anti-rachitique n'a pour ainsi dire pas été modifié dans sa teneur en carbone.

L'hydrophilie des stérols est également modifiée par l'irradiation.

Pour un même stérol une irradiation d'une demi-heure diminue cette hydrophilie de moitié. Une irradiation de 6 heures la diminue du quart. Une irradiation de 100 heures la fait totalement disparaître. Nous avons remarqué que quelques réactions permettent de différencier les stérols avant et après irradiation.

La réaction de Rosenheim à l'acide trichloracétique à 90 % qui donne avec l'ergostérol une teinte bleue pâle donne avec ce même stérol après irradiation une teinte vert émeraude intense qui passe dans le chloroforme. Cette teinte est surtout marquée au niveau des cristaux d'ergostérol.

Le cholestérol d'huile de foie de morue donne légèrement cette réaction mais seulement après irradiation. Aucun autre stérol ne la donne ni avant ni après irradiation.

C'est donc une réaction qui semble spécifique de l'ergostérol irradié. C'est ce corps qui, accompagnant le cholestérol de morue donnerait la réaction.

Si à une solution alcoolique de résorcine contenant une trace d'HCl on ajoute une solution alcoo-

lique de stérol et qu'on fasse bouillir une minute, en projetant le mélange dans l'eau, on obtient un précipité blanc. Il est beaucoup plus abondant et jaune avec un stérol irradié.

De plus, par évaporation on voit apparaître sur les parois du verre une très belle cristallisation rouge avec le stérol non irradié. Il ne se produit avec le stérol irradié qu'une cristallisation jaune sale.

### CONCLUSION

Si l'on se place en face des diverses formules des produits contenus dans la bile : cholestérine, acide biliaire, pigments biliaires, on est frappé par leur complexité. Il ne s'agit pas, comme dans l'urine ou dans l'air expiré, de simples molécules d'élimination dont la destinée physiologique peut être prévue par l'aspect chimique. Ce que nous voyons, ce sont des molécules encore complexes, capables semble-t-il de jouer dans l'organisme un rôle plus noble. Elles représentent, et c'est là un fait singulier, des ressources énergétiques qui ne seront jamais entièrement utilisées par l'organisme. Peut-être la cause réside-t-elle dans ce fait que le foie offre là à l'organisme une sécrétion, et ce rôle semble le plus important, le rôle excréteur lui restant subordonné.

L'irradiation apporte dans l'édifice moléculaire des stérols, des modifications dont on ne peut encore préciser le mécanisme intime.

Ces modifications qui portent en particulier sur le point de fusion, le pouvoir rotatoire, l'hydrophilie et un certain nombre de réactions, sont parallèles à l'action thérapeutique de ces stérols. En effet sont seuls transformés ceux dont l'activité biochimique est intensifiée par l'irradiation.

Parmi les phytostérols c'est l'ergostérol et chez les zoostérols, c'est le cholestérol d'huile de foie de morue qui subissent les transformations les plus profondes. Les modifications de ce zoostérol ne sont probablement dues qu'aux traces d'ergostérol qui accompagnent sa molécule.



## CHAPITRE II

### TECHNIQUES D'ISOLEMENT

#### DES DIVERS STÉROLS

Nos recherches ont porté sur une vingtaine d'échantillons de stérols, d'origine diverse, appartenant soit au règne animal, soit au règne végétal et dont quinze ont été extraits par nous.

Cette extraction, qui pour certains d'entre eux, est d'une grande simplicité, présente pour d'autres des difficultés inattendues, qui ont considérablement retardé nos recherches ultérieures.

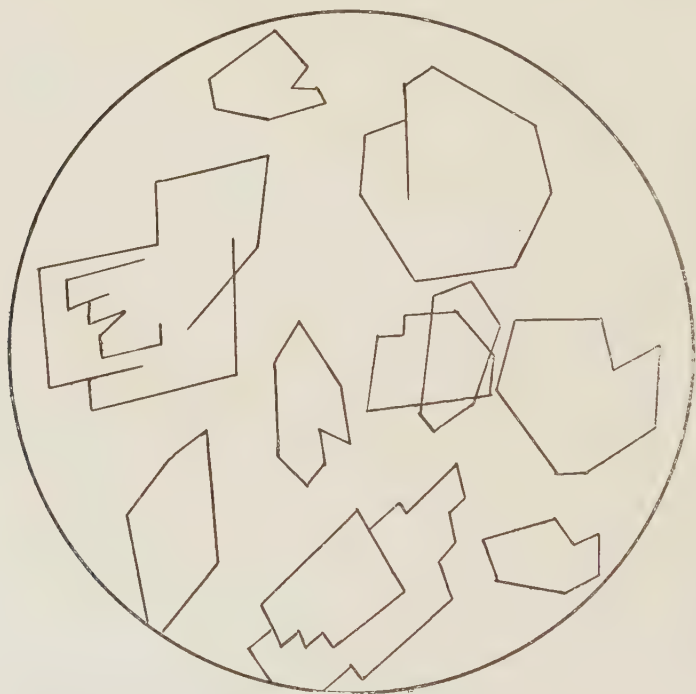
Nous allons brièvement exposer les différentes techniques employées, les rendements, ainsi que les caractères physiques et chimiques des produits obtenus pour chaque extraction.

#### CHOLESTÉROL DES CALCULS BILIAIRES.

Les calculs broyés au mortier sont épuisés par l'eau bouillante alcalinisée par un peu de potasse caustique ; on saponifie ainsi la plus grande partie des graisses. Le tout est alors épuisé par l'alcool

bouillant. L'alcool d'épuisement est filtré à chaud. Par refroidissement, le cholestérol cristallise de cette solution alcoolique.

Pour le purifier, on le fait bouillir avec de la potasse alcoolique, pour saponifier les graisses qui pourraient le souiller. L'alcool distillé, le résidu est repris par l'éther à 66° anhydre qui dissout le cholestérol et laisse les savons. De la solution étherée, le cholestérol cristallise, on le purifie par six recristallisations de l'alcool à 80°.



Cholestérol des calculs biliaires cristallisé de l'alcool.

P. F. tube capillaire=148°,8 corr.

$[\alpha]_D = -36^\circ 49$  en solution chloroformique.

## CHOLESTÉROL DU CERVEAU

Nous nous sommes adressés au cerveau de bœuf.

Ces cerveaux, débarrassés des méninges et des caillots, ont été broyés au hache-viande et triturés avec du sable siliceux et trois parties de sulfate de chaux, suivant la méthode préconisée par Grigaut.



Cholestérol du cerveau cristallisé de l'alcool.

La masse fait prise, on la pulvérise et on la dessèche, autant que possible à l'abri de l'air et de la lumière. On agite à plusieurs reprises la poudre sèche

avec de l'acétone anhydre à la température ordinaire, on distille l'acétone jusqu'à l'obtention d'un résidu d'où le cholestérol cristallise. On le purifie par plusieurs recristallisations dans l'alcool à 80°. La solubilité du cholestérol dans l'acétone à +18° n'est que de 8 gr. 38 pour mille ; mais ce solvant a l'avantage de ne pas dissoudre les cérébrosides, comme l'éther et le chloroforme. On évite ainsi la séparation du cholestérol de ces corps, toujours très laborieuse.

P. F. tube capillaire=148°8 corr.

$[\alpha]_D = -37^{\circ}1$  en solution chloroformique.

#### CHOLESTÉROL DU CERVEAU HUMAIN

Nous avons isolé séparément le cholestérol de la substance blanche et de la substance grise du cerveau humain (cerveau de femme).

Les cerveaux ont été congelés et, par dissection, on a séparé avec assez de facilité la substance grise de la partie superficielle du cerveau, et des noyaux gris centraux. La substance blanche est isolée beaucoup plus difficilement et reste souillée de traces de substance grise. La technique d'isolement est la même que pour le cerveau de bœuf.

Les rendements ont été trouvés :

| Substance blanche | Substance grise |
|-------------------|-----------------|
| 16,2              | 6,8             |
| 16,4              | 7,1             |

Ces chiffres concordent avec ceux fournis par les analyses de Koch et de Minonici qui donnent pour la substance blanche 17 % et pour la substance grise 7,2 %.

Cristaux identiques à ceux du cerveau de bœuf.

P. F. tube capillaire=148°8 corr.

$\alpha]_D = -37^{\circ}0$  en solution chloroformique.

#### CHOLESTÉROL DU SANG DE BŒUF.

Suivant la méthode de Lifschütz, cinq litres de sang de bœuf fraîchement émis des vaisseaux sont desséchés au bain-marie. La masse brun noire extrêmement dure est broyée aussi finement que possible et épuisée huit heures par la benzine. On distille la benzine. Il reste une masse grasseuse, molle, très visqueuse, brun rouge foncé qui reste complètement transparente même au delà de 100°, mais se maintient toujours très épaisse et visqueuse. Elle représente 1,5 à 1,8 du sang sec. Elle se dissout facilement dans tous les dissolvants des graisses, mais difficilement et seulement en parties dans l'alcool. Elle rappelle l'aspect et l'odeur de la lanoline. Elle donne fortement la réaction de Liebermann et la réaction de Lifschütz: forte coloration verte avec spectre d'absorption très net de l'oxycholestérol. Mais la couleur de cette réaction apparaît trouble et sale à cause d'une forte proportion d'impuretés de la masse grasseuse. Mais, si on filtre le mélange

provenant de la réaction, et si on lave le filtre avec un peu d'acide acétique, on obtient une solution d'un vert intense et pur avec bandes d'absorption très nette de l'oxycholestérol dans le rouge. Le spectre des éthers de l'oxycholestérol dans le jaune n'apparaît pas, en règle générale.

La masse graisseuse rouge est saponifiée par la potasse alcoolique. Après refroidissement du mélange saponifié, il se sépare une quantité importante de substances cristallines, le mélange est alors, *sans filtrer*, additionné de son égal volume d'eau. Agité trois fois soigneusement avec de l'éther et les solutions étherées réunies sont lavées à plusieurs reprises avec de l'eau en présence de phtaléine du phénol. Après évaporation de l'éther, élimination de l'eau et deshydratation plusieurs fois par l'alcool absolu au bain-marie, il se sépare une importante quantité de paillettes blanches brillantes, qui sous le microscope font voir les tables bien connues du cholestérol et qui après dessiccation complète de la substance apparaissent comme noyés dans une masse amorphe jaune claire, prédominante.

L'insaponifiable ainsi obtenu apparaît sous la forme d'une masse jaune clair, solide, grumeleuse, un peu grasse, qui ne fond pas au bain-marie et qui possède les propriétés et les caractères de solubilité d'un mélange de cholestérol et de ses produits neutres d'oxydation.

On obtient la réaction de Liebermann avec ses colorations rouge, bleu, vert et son spectre, et la réaction de Lifschütz avec autant de pureté et d'in-

tensité qu'avec l'oxycholestérol artificiel préparé à partir du cholestérol par l'action du permanganate de potasse. Indépendamment du spectre d'absorption dans le rouge et le jaune, on voit apparaître deux bandes dans le vert et le bleu qui, suivant toute apparence proviennent d'un nouveau corps neutre. Pour observer dans les meilleures conditions ce spectre d'absorption compliqué, on opère



Cholestérol du sang de bœuf cristallisé de l'alcool.

de la façon suivante, conseillée par Lifschütz : dans un petit verre à réaction, on prend quelques milligrammes d'insaponifiable, qu'on dissout dans 3 cen-

timètres cubes d'acide acétique glacial et dans lequel on fait glisser avec précaution 6 à 8 gouttes d'acide sulfurique concentré.

Pour séparer le cholestérol de l'insaponifiable, on reprend par l'alcool méthylique à 99°. Par évaporation, le cholestérol cristallise, on le purifie par six cristallisations dans l'alcool éthylique à 80°.

P. F. tube capillaire=141°8 corr.

$[\alpha]_D = -48^{\circ}2$  en solution chloroformique

#### CHOLESTÉROL DE LA MOELLE OSSEUSE

La graisse est saponifiée par la potasse alcoolique. Les savons sont épuisés par l'éther qui laisse le cholestérol cristalliser, on le purifie par six cristallisations de l'alcool à 80°.

P. F. tube capillaire=143°5 corr.

$[\alpha]_D = -42^{\circ}3$  en solution chloroformique.

Cristaux identiques à ceux du sang.

#### CHOLESTÉROL DE HARENGS

Nous avons préparé ce stérol à partir :

- 1° des harengs saurs ;
- 2° des harengs frais de la mer du Nord ;
- 3° des organes génitaux de harengs frais ;
- 4° de l'huile de harengs conservée au laboratoire depuis vingt-cinq ans.

Dans tous les cas, la matière première a été broyée, puis desséchée au bain-marie et à l'étuve. La masse séchée a été pulvérisée et épuisée par la benzine au Kumagawa. La benzine distillée a abandonné une huile noire abondante.

— *Harengs saurs.*

Vingt harengs saurs, du poids moyen de 100 grammes, ont donné 1 kg. 185 de matière sèche et 330 grammes d'huile. On saponifie cette huile par 33 grammes de potasse caustique dans 330 grammes d'alcool, au réfrigérant à reflux pendant trois heures. L'alcool est distillé. Les savons potassiques séchés et épuisés par l'acétone au Kumagawa. L'acétone laisse après distillation, cristalliser le cholestérol en belles lames classiques. On purifie par plusieurs recristallisations de l'alcool à 80°. Rendement 1 gr. 60, soit 0,48 %.

— *Harengs frais.*

10 kilogrammes de harengs frais ont donné 880 grammes d'huile qui a été saponifiée par 230 grammes de potasse alcoolique.

Rendement en cholestérol: 5 gr. 7, soit 0,64 %.

— *Les organes génitaux* (ovaires et testicules) pesant ensemble 1 kilogramme, traités par la même technique, ont abandonné 70 grammes d'huile qui, après saponification, ont donné 0 gr. 80 de cholestérol.

Rendement: 1,1 %.

— L'huile de harengs conservée depuis vingt-

cinq ans avait laissé dans le fond du flacon une abondante cristallisation d'acides gras, dans laquelle apparaissaient des cristaux de cholestérol.

Après saponification de 1 kg. 500 d'huile par 350 grammes de potasse en solution alcoolique et épuisement des savons par l'acétone, on obtient comme rendement: 6 gr. 3 de cholestérol, soit 0,42 %.

Ce sont les organes génitaux qui ont fourni le meilleur rendement. Puis les harengs frais. Pour les harengs saurs et l'huile très ancienne, le cholestérol a dû s'oxyder en partie à l'état d'oxycholestérol qui reste dans les eaux-mères, sous forme d'un sirop noir, très épais. On obtient la réaction de Lifschütz à partir de ce sirop.

Quant aux formes cristallines, elles sont identiques, quelle que soit la matière première dont on est parti. On retrouve toujours les grandes lames du cholestérol classique, identiques en tous points à celles du cholestérol des calculs biliaires.

P. F. tube capillaire=148°8 corr.

$[\alpha]_D = -36^{\circ}9$  en solution chloroformique.

#### CHOLESTÉROL D'HUILE DE FOIE DE MORUE.

C'est l'extraction de l'insaponifiable et l'isolement du cholestérol de cette huile qui nous a donné le plus de difficultés. Tous les savons obtenus par les différents alcalis sont solubles dans tous les solvants. A la suite de nombreuses tentatives pour

réaliser la saponification par la soude, la potasse, la baryte ou la chaux, en utilisant, comme liquides extracteurs le chloroforme, la benzine, l'éther, le toluène, l'éther de pétrole, le tétrachlorure de carbone, l'acétone, nous nous sommes arrêtés à la technique suivante inspirée des travaux de Lifschütz.

Saponification pendant une heure au bain-marie de l'huile de foie de morue de Terre-Neuve, extraite des foies frais aussitôt après la pêche. Trois litres sont traités par la potasse alcoolique (750 grammes dans Q. S. d'alcool à 90°). Distillation de l'alcool. Le savon potassique dissout dans l'eau est décomposé par un lait de chaux en grand excès. Le savon calcaire, lavé à plusieurs reprises, rapidement et parfaitement desséché autant que possible à l'abri de l'air est épuisé par l'acétone à l'appareil de Kumagawa. Cette acétone a été au préalable deshydratée par distillation en présence de sulfate de soude desséché.

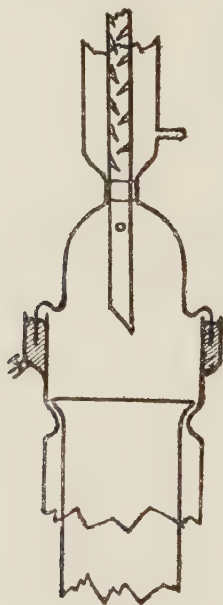
Après épuisement, l'acétone est distillée jusqu'à obtention d'un sirop de couleur brune qui, traité par l'alcool méthylique à 99°, suivant la méthode de Lifschütz, abandonne des cristaux en houppes qu'on purifie par six recristallisations de l'alcool éthylique à 80°.

Rendement 1 ‰. On obtient en même temps un sirop incristallisable qui contient d'autant plus d'oxycholestérol que les opérations précédentes ont été menées moins rapidement et qui donne la réaction de Lifschütz de façon particulièrement bril-

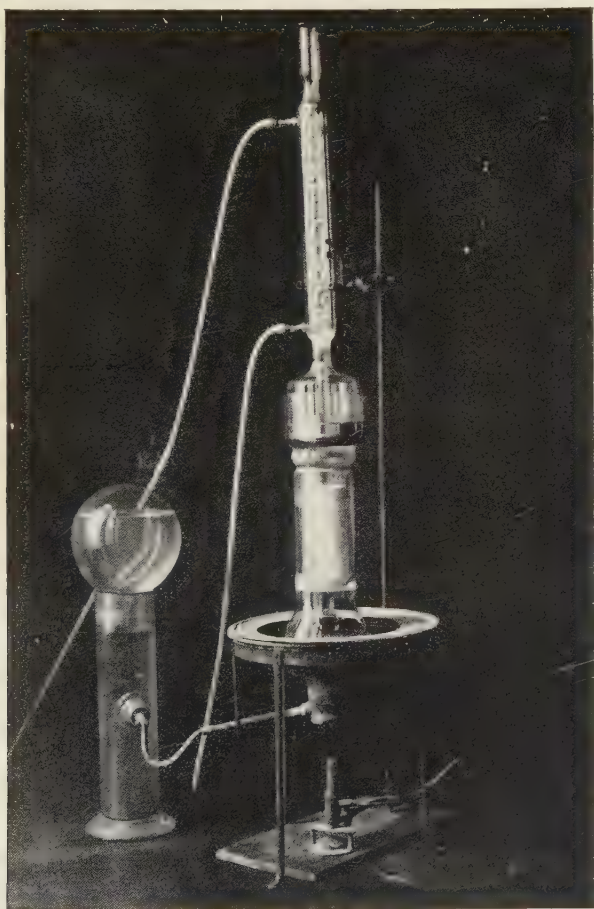
lante. La dessiccation rapide et à l'abri de l'air des savons calciques importe beaucoup sur le rendement en cholestérol.

En raison de la masse des matériaux à traiter, nous avons dû faire établir par la maison Leune des appareils de Kumagawa en pyrex de grande dimension. Le ballon contenant le liquide avait une capacité d'un litre dans sa partie renflée. La cartouche pouvait contenir 500 grammes de savons secs.

Nous avons même été amenés à modifier le modèle primitif en remplaçant la fermeture rodée, dont la fragilité limite la dimension des appareils courants, par une fermeture à joint de mercure comme le modèle ci-contre :



Le métal étant versé dans une cuve circulaire ménagée sur le col du ballon et dans laquelle plonge une cloche qui supporte le réfrigérant. Cette cloche présente un étranglement qui permet au solvant, après condensation, de ne pas tomber sur le mercure. A la fin de chaque extraction, on peut décantier le mercure à l'aide d'un robinet placé à la partie déclinive de la cuve circulaire qui le contient.



Si l'on ne se préoccupe pas des rendements, une technique beaucoup plus simple et qui n'est qu'une variante de la précédente consiste à agiter l'huile de foie de morue avec de l'alcool éthylique à 95°, ou de l'alcool méthylique à 99° pendant trois heures; on obtient par décantation, et distillation du solvant, l'insaponifiable mêlé à de l'huile sous la forme d'un liquide visqueux, jaune ambré, plus foncé dans le cas de l'alcool éthylique, et qui, par évaporation dans le vide, abandonne en partie par cristallisation, le cholestérol, dont l'isolement du sirop est impossible. Pour l'avoir à l'état pur, il faut, par saponification à l'aide de la chaux se débarrasser des traces d'huile entraînées mécaniquement. La technique est alors identique à la précédente, à cette différence près qu'on n'est pas gêné par une masse considérable de matière. Cette méthode présente en plus l'avantage de laisser l'huile dépourvue de tout ou partie de son insaponifiable, suivant le nombre d'épuisements, mais à l'état d'huile. Comme nous le verrons par la suite, elle nous a permis des essais physiologiques.

Le cholestérol d'huile de foie de morue se différencie des stérols extraits précédemment et en particulier de celui des calculs biliaires ou des harengs par la forme irrégulière de ses cristaux.

Il se rapproche au contraire par son aspect cristallin de celui extrait du cerveau et plus encore de celui du sang.

La cristallisation de l'alcool à 80° apparaît macroscopiquement comme formée de houppes cris-

tallines qui, au microscope sont constituées par des lames minces, incurvées, flexibles, terminées en pointe, souvent tronquées, et réunies en un centre commun. A côté on trouve des figures ressemblant à des feuilles de chêne ou à des croissants, mais il est exceptionnel de rencontrer des lames à arêtes rectilignes de cholestérol classique.



Cholestérol de l'huile de foie de morue  
cristallisé de l'alcool.

P. F. tube capillaire =  $145^{\circ}8$  corr.

$[\alpha]_D = -47^{\circ}5$  en solution chloroformique.

### CHOLESTÉROL D'ŒUFS.

Nous sommes partis, d'une part d'œufs frais, d'autre part d'une huile d'œufs conservée depuis vingt-cinq ans au laboratoire, sans présenter aucun rancissement et qui, comme l'huile de harengs, avait laissé déposer au fond du flacon des acides gras mélangés de quelques paillettes de cholestérol.

2 kgr. 400 de cette huile ancienne ont été saponifiés par 500 grammes de potasse caustique en solution alcoolique d'abord à froid, puis quatre heures au bain-marie à reflux.

Les savons séchés sont épuisés par l'acétone au Kumagawa. L'acétone distillée laisse cristalliser de magnifiques lames de cholestérol classique.

P. F. tube capillaire = 148°8 corr.

$[\alpha]_D = -44^{\circ}8$  en solution chloroformique.

L'isolement à partir des œufs frais n'a différé en rien ; le rendement a été le même pour une même quantité d'huile et le cholestérol a présenté les mêmes constantes physiques.

Cependant, au point de vue des formes cristallines, nous avons pu observer au microscope en quelques heures les modifications suivantes :

Après l'épuisement à l'acétone, celle-ci par distillation abandonne une huile jaune brun. Une goutte de cette huile au microscope, donne l'aspect d'une infinité de gouttelettes non encore cristallisées. Au

bout d'une demi-heure, à la lumière solaire, apparaissent parmi ces gouttelettes de nombreuses aiguilles enchevêtrées et souvent réunies autour d'un centre commun.

Deux heures après, le solvant s'étant lentement évaporé, il ne reste plus de gouttes d'huile, on voit encore quelques aiguilles, mais les grandes lames classiques du cholestérol sont la grande majorité. Les aiguilles persistent là où il reste encore trace de solvant.

#### ERGOSTÉROL DU SEIGLE ERGOTÉ.

Le seigle ergoté, broyé en poudre fine, est épuisé au Kumagawa, par dix fois son poids d'alcool à 90°. On distille l'alcool et le résidu est lavé plusieurs fois à l'éther.

L'éther, distillé à son tour, abandonne une masse huileuse, bourrée de cristaux. On essore à la trompe, puis on reprend par la potasse alcoolique pour saponifier les graisses, enfin par de l'alcool à 90°, rendement 0,2 pour 1000.

L'ergostérol ainsi préparé est loin d'être pur. C'est un mélange d'ergostérol, de fongistérol et de zymostérol. Pour les séparer, on utilise leur différence de solubilité dans l'éther, l'ergostérol étant le moins soluble. Le mélange est donc repris par l'éther chaud d'où l'ergostérol se dépose en partie par refroidissement. Le pouvoir rotatoire augmente à chaque opération et finit par se fixer à  $[\alpha]_D = -126^\circ$  qui indique la pureté du produit.

Les eaux mères éthérées, concentrées, donnent toute une série de produits cristallisés, dont le pouvoir rotatoire va en s'abaissant jusqu'à  $[\alpha]_D = -22.4$ , à ce point, on a le fongistérol.

#### ERGOSTÉROL DE LEVURE DE BIÈRE.

L'extraction en est beaucoup moins laborieuse.

100 grammes de levure sèche sont épuisés par l'alcool à 90° au Kumagawa. L'alcool distillé abandonne 30 grammes de graisses. On saponifie ces graisses par la potasse alcoolique et on épuise les savons par l'acétone à chaud. On obtient 12 grammes d'insaponifiable, d'où environ 2 gr. 4 de stérols cristallisent. On les purifie par des cristallisations répétées de l'alcool à 80°. Ces stérols sont un mélange d'au moins trois corps :

— L'ergostérol lévogyre, en petite quantité ; le zymostérol dextrogyre, environ 0 gr. 5 et le fongistérol lévogyre en très faible quantité.

Par des traitements éthéro-alcooliques, on sépare une fraction de tête très lévogyre qui contient environ les 9/10<sup>e</sup> d'ergostérol et 1/10<sup>e</sup> de fongistérol. On sépare ces deux corps comme dans la préparation à partir de l'ergot, par leur différence de solubilité dans l'éther. La seconde fraction ne montre qu'une faible déviation polarimétrique, tantôt à gauche, tantôt à droite. On traite à froid par 15 ou 20 volumes d'éther anhydre, par filtration, on sépare une petite quantité d'une substance peu soluble, non phosphorée qui ne donne pas nettement les

réactions des stérols et est dextrogyre. Elle se gonfle par l'eau et rend toute filtration impossible. Elle est soluble dans le chloroforme, très peu soluble dans l'éther. Dissoute à chaud dans l'alcool fort, celui-ci se prend en une gelée homogène par refroidissement.

Par des concentrations successives, on sépare des cristallisations dont les premières sont plus dextrogyres que les dernières ; celles-ci ayant une grande tendance à s'oxyder à l'air et à se résinifier en un produit incristallisable. Chaque portion est reprise à son tour par de l'éther anhydre, filtrée, et fractionnée méthodiquement pour séparer les produits de plus en plus dextrogyres. Au bout d'une longue série de cristallisations dans l'éther, on arrive à obtenir un stérol, ayant un pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D = +34^\circ$ ) ne variant presque plus d'une fractionnement à l'autre. C'est le zymostérol découvert en 1928 par Mrs Ida Smedley Mac Lean.

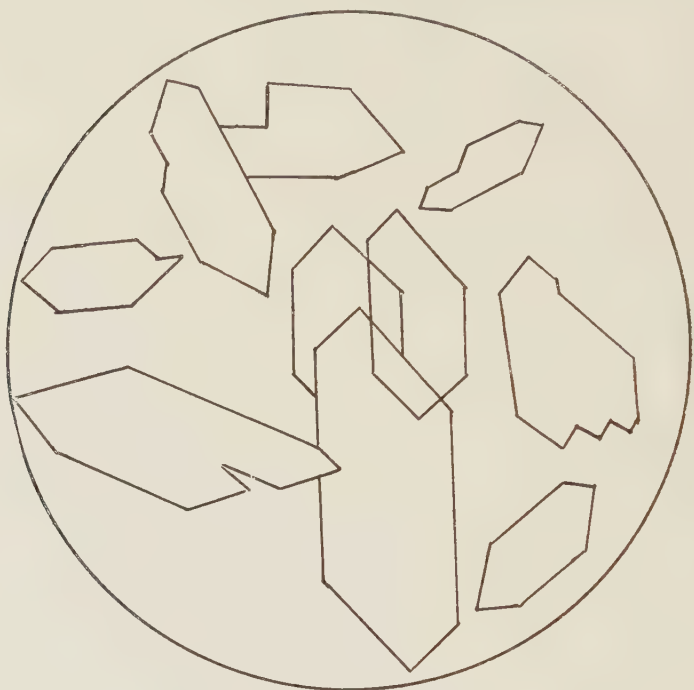
Les rendements sont à peu près égaux en ergostérol et en zymostérol.

Soit en ergostérol 1 à 1,5 ‰, et en zymostérol 1 ‰ de levure fraîche. La quantité de fongistérol étant environ le dixième de celle d'ergostérol.

*L'ergostérol* a été isolé pour la première fois par Tanret en 1889 de l'ergot de seigle.

Cristallisé de l'alcool à 95° bouillant, il se présente sous la forme d'hexagones plus ou moins irréguliers, dont les arêtes nettes, opposées, sont toujours parallèles et qui présentent parfois des angles

rentrants. Système monoclinique. De l'éther: en fines aiguilles souvent reliées à un centre commun.



Ergostérol de levure cristallisé de l'alcool.

De l'acide acétique, les cristaux sont beaucoup moins réguliers et rappellent par leur aspect les lames du cholestérol des calculs.

Soumis à l'analyse élémentaire, nous avons trouvé:

|                                                    |          | CO <sub>2</sub> | H <sub>2</sub> O |
|----------------------------------------------------|----------|-----------------|------------------|
| Matière :                                          | 4 mg 512 | 13 mg 260       | 4 mg 47          |
| Trouvé :                                           |          | C=80,11 %       | H=10,99 %        |
| Calculé pour :                                     |          |                 |                  |
| C <sup>27</sup> H <sup>4</sup> O. H <sup>2</sup> O |          | C=81,0          | H=11,0           |

L'ergostérol ne se deshydrate qu'à 105°. Il est soluble dans 36 parties d'alcool chaud à 95° et dans 526 parties d'alcool froid. Dans 50 parties de chloroforme à froid et très soluble dans le chloroforme chaud, d'où il cristallise en partie deshydraté. Dans 28 parties d'éther anhydre bouillant et 50 parties à 20°. Il est soluble à 0,25 % dans l'huile d'olive.

Il fond en tube scellé à 166° 8 corr. La mesure de son pouvoir rotatoire à 18°—20° en solution chloroformique nous a donné —123°.

Sur ces deux points, les auteurs ne sont pas d'accord, comme en rend compte le tableau ci-contre qui montre les très grandes divergences dans la valeur du point de fusion et du pouvoir rotatoire, suivant les expérimentateurs et le degré d'hydratation.

| Expérimentateurs                            | P. F.      | Pouvoir<br>rotatoire<br>(en $\text{CHCl}_3$ ) | Remarques                                    |
|---------------------------------------------|------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| C. Tanret, 1889 . . . . .                   | 165°       | —126 hydraté<br>—132 anhydre                  |                                              |
| Gérard, 1897. . . . .                       | 135°--136° | —105°                                         |                                              |
| Hinsberr et Ross, 1903..                    | 159°       |                                               |                                              |
| Neville, 1913 . . . . .                     | 145°--147° |                                               | (a) <sub>D</sub> = —74,54<br>(solvant ?)     |
| Mersenheimer, 1915 . .                      | 156°--157° |                                               |                                              |
| Mac Lean et Thomas,<br>1920. . . . .        | 154°       | —117                                          |                                              |
| Windaus et Grosskopf,<br>1922. . . . .      | 154°       |                                               |                                              |
| Reindel, Walter et<br>Rauch, 1927 . . . . . | 160°--161° | —117° hydraté                                 |                                              |
| Reindel et Walter, 1928                     | 160°       |                                               |                                              |
| Morton, 1928. . . . .                       | 158°5      | —100                                          |                                              |
| Windaus et Borgeaux,<br>1928. . . . .       | 163°       | —130                                          |                                              |
| Bills et Honeywell, 1928                    | 168°       | —132                                          | presque anhydre.<br>semi-anhydre.<br>hydraté |
| — — — — —                                   | 175°       |                                               |                                              |
| — — — — —                                   | 183°       |                                               |                                              |
| Hugoumenq et Couture,<br>1929. . . . .      | 166°8      | —123                                          | semi-anhydre.                                |

Ces divergences proviennent de la grande difficulté que l'on éprouve à isoler l'ergostérol à l'état de pureté absolue.

Examiné à la lumière de Wood ( $\lambda = 3650 \overset{\circ}{\text{Å}}$ ) l'ergostérol présente une fluorescence violette, que Rosenheim attribue à une altération par oxydation.

L'ergostérol pur absorbe les radiations de courte longueur d'onde mille fois plus que le cholestérol. Cette absorption maxima est localisée entre 2.700

et 3.000 U Å qui se résout en trois ou quatre maxima.

— *Propriétés chimiques.*

Si on l'abandonne à l'air et à la température ordinaire, mais surtout si on le laisse à la lumière même diffuse, l'ergostérol s'oxyde lentement, jaunit et devient odorant. La température accélère cette altération. Les solutions chloroformiques verdissent puis brunissent à la lumière en quelques jours.

— *Liaisons éthyléniques.*

Windaus et Grosskoff ont par hydrogénation, démontré la présence de trois doubles liaisons dans la molécule d'ergostérol. Les mesures de l'indice d'iode effectuées par Smedley Mac Lean, Thomas et Daubney ont confirmé ce chiffre.

H. Penau et G. Tanret signalent que par la méthode de Hübl il faut mettre la substance au contact dix-huit heures à  $t=20^{\circ}$  et un grand excès de réactif iodé. Ces auteurs, donnent comme chiffres par la technique codex:

|                                     |                  |
|-------------------------------------|------------------|
| 2 heures et glacière. . . . .       | 123,4            |
| 18 heures — . . . . .               | { 136,6<br>143,2 |
| 18 heures et $20^{\circ}$ . . . . . |                  |
|                                     | 162              |

En doublant la quantité d'iode, ils ont obtenu:

|                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| 18 heures à $20^{\circ}$ . . . . . | 209,5 |
|------------------------------------|-------|

Nous avons opéré en suivant ces indications pour 0 gr. 25 d'ergostérol dans 10 centimètres cubes de

chloroforme — solution alcoolique d'iode à 5 % : 20 centimètres cubes — solution alcoolique de  $\text{HgCl}_2$  à 6 % : 20 centimètres cubes — 18 heures de contact = 188,9.

M. Mac Lean, donne 190,5.

— *Fonction alcool* : G. Tanret a obtenu cristallisés des éthers formique, acétique et butyrique. Comme le cholestérol dont Berthelot a établi la fonction alcoolique, l'ergostérol est un alcool monoatomique. Sans qu'on puisse préjuger de la position de cette fonction dans l'édifice moléculaire. Gaubert étudiant ces éthers a remarqué qu'ils possèdent une phase liquide anisotrope. Les cristaux liquides des éthers de l'ergostérol sont plus visqueux que ceux du cholestérol.

— *Réactions.*

Ce sont en général celles du cholestérol.

Deux en différent légèrement :

— *Réaction de Liebermann* : Si on dissout l'ergostérol dans une petite quantité de chloroforme et qu'on ajoute un volume égal d'anhydride acétique, puis la plus petite quantité possible d'acide sulfurique concentré et pur, on obtient immédiatement à froid une magnifique teinte rouge groseille qui persiste à peine quelques secondes et passe très rapidement au bleu, puis plus rapidement encore au vert émeraude. Cette teinte verte, un peu plus stable que celle obtenue avec le cholestérol, s'altère néanmoins peu à peu et passe au jaune.

— *Réaction de Salkowski* : L'acide sulfurique concentré colore en rouge orangé les cristaux de cholestérol, mais ne les dissout que lentement et incomplètement à froid. Si on agite alors avec du chloroforme, celui-ci dissout instantanément le reste des cristaux en se colorant en jaune. Si on agite le mélange, la teinte du chloroforme se fonce et l'acide sulfurique se décolorant peu à peu, prend une teinte dichroïque verte.

L'ergostérol est bien comme le cholestérol coloré en rouge orangé par l'acide sulfurique ; mais la dissolution est rapide et complète. L'agitation avec du chloroforme laisse ce solvant totalement incolore. L'acide garde toute la coloration. La réaction est plus nette et la différenciation plus marquée si on dissout au préalable les stérols dans le chloroforme. Si dans cette solution chloroformique on verse goutte à goutte l'acide sulfurique, celui-ci tombe au fond du tube et un anneau coloré ne tarde pas à apparaître à la limite de séparation des deux liquides.

Pour le cholestérol, l'addition d'acide sulfurique trouble la solution chloroformique qui devient laiteuse. L'anneau est rouge, se forme rapidement et augmente. L'agitation fait passer toute la coloration dans le chloroforme qui est rouge et devient violet au bout de quelques heures.

Pour l'ergostérol, l'addition d'acide sulfurique laisse le chloroforme limpide. Par agitation légère, le chloroforme se teinte bien en rouge, mais une agitation violente fait passer toute la coloration dans l'acide sulfurique.

Après irradiation, le cholestérol donne une réaction de Salkowsky identique, mais l'ergostérol donne à l'acide sulfurique une teinte plus foncée, rouge sang.

En solution chloroformique, l'ergostérol donne avec le pentachlorure d'antimoine une très belle coloration rouge très persistante.

Rosenheim signale comme spécifique la coloration bleue intense fournie par l'hydrate de chloral fondu.

Le même auteur signale une réaction bleue avec l'acide trichloracétique à 90 %.

*Le fongistérol* répond à la formule  $C^{25}H^{40}O.H^2O$ . C'est l'homologue inférieur de l'ergostérol. Il a les mêmes formes cristallines. Il est plus soluble que l'ergostérol dans les différents solvants.

Il se dissout dans 18 parties d'alcool à 96° bouillant et 187 parties à froid.

Le chloroforme le deshydrate en donnant une solution louche.

Il fond en tube capillaire à 147° corr. Son pouvoir rotatoire  $[\alpha] = -22.04$  en solution chloroformique mais très difficile à mesurer en raison de l'aspect laiteux de la solution. Il faut ajouter 2 % d'alcool absolu. Il s'oxyde à l'air, devient jaune et odorant.

D'après Rosenheim et Webster, il ne possède pas de spectre d'absorption et n'est pas activable par irradiation.

**ZYMOSTÉROL.** — Isolé récemment de la levure de bière par Mrs Smedley Mac Lean.

Nous sommes parvenus à isoler un échantillon qui, recristallisé six fois dans l'alcool à 90°, nous a donné comme pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D = + 33.02$  en solution chloroformique avec 2 % d'alcool absolu. Cristallise en lamelles ou en aiguilles agglomérées en oursins.

Soluble dans 25 parties d'alcool à 96° dans 10<sup>4</sup> parties d'éther, dans 15 parties d'acétone.

L'analyse nous a donné pour l'échantillon soumis vingt-quatre heures au vide sulfurique, en présence d'oxyde de cuivre et de chromate de plomb:

|                                                                                | CO <sup>2</sup> | H <sup>2</sup> O |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| Matière: 4 mg 944                                                              | 13 mg 845       | 5 mg 64          |
| Trouvé:                                                                        | C=76,33 %       | H=12,66 %        |
| Calculé pour C <sup>27</sup> H <sup>42</sup> O <sup>2</sup> , H <sup>2</sup> O | C=77,88         | H= 9,45          |

Notre échantillon paraît donc assez pur, mais hydraté.

Les analyses fournies récemment par H. Penau et G. Tanret ont donné:

C=de 77,04 à 77,58      H= de 10,60 à 10,24

Or ces auteurs ont analysé des échantillons séchés à l'air à poids constant puis exposés sur le vide sulfurique où les cristaux ont perdu de 3,2 à 3,8 %.

A l'étuve à 80°, la perte est de 4,5 % à 100° —103°; le stérol se colore et la perte atteint 5,4 % accompagné d'une fusion totale et d'un brunissement marqué. Remis à l'air, un échantillon de stérol deshydraté bien blanc a repris la totalité de son eau de cristallisation. Lors de sa préparation, lors-

que le zymostérol se dépose de l'éther anhydre, il absorbe rapidement l'humidité de l'air et finalement cristallise hydraté. Ces auteurs signalent que les corps de la famille de l'ergostérol ne perdent leur eau que partiellement à froid dans le vide sulfurique, la deshydratation totale n'ayant lieu qu'au delà de 100° et s'accompagnant d'oxydation et de décomposition partielle.

Nos analyses sont donc, à part le taux d'hydrogène, en concordance avec celles de ces auteurs.

Ne disposant pas d'une quantité de matière suffisante, nous n'avons pas pu mesurer l'indice d'iode.

H. Penau et G. Tanret donnent comme chiffres en suivant la méthode de Hübl.

à 0°=169,1

à 20°=190 —201

Or, l'existence dans la molécule de trois doubles liaisons reconnues par Mrs Mac Lean exige :

pour  $C^{27}H^{42}O^2, H^2O$ . . . 183,2

Ces mêmes auteurs ont obtenu l'éther acétique.

#### — Réactions colorées.

*Réaction de Liebermann :* Si on dissout le zymostérol dans le chloroforme, par addition d'anhydride acétique, on obtient un louche qui se dissout par 1 gramme d' $SO^4H^2$ . On obtient alors une très légère teinte verte à peine marquée, mais pas la belle teinte rouge de l'ergostérol. Cette teinte verte passe rapidement au jaune très pâle.

Si on dissout le zymostérol dans l'anhydride acétique et qu'on ajoute 1 à 2 grammes d' $SO^4H^2$ , on obtient de même cette teinte très légère.

Il est probable que cette réaction n'est due qu'aux traces d'ergostérol qui accompagnent le zymostérol.

*Réaction de Salkowsky:* L'acide sulfurique dissout très difficilement le zymostérol et se colore à peine en rose très pâle. Cette teinte passe dans le chloroforme. Elle est peu persistante et vire au jaune. Elle ne paraît pas non plus spécifique du zymostérol.

Il en est de même pour le pentachlorure d'antimoine qui donne une teinte rose très pâle et très fugace.

De même encore pour la réaction de Rosenheim signalée à propos de l'ergostérol, avec l'hydrate de chloral fondu. On n'obtient qu'une teinte bleue à peine marquée.

Pour la réaction de Rosenheim à l'acide trichloracétique à 90 %, on n'obtient rien avec le zymostérol.

En résumé, le zymostérol ne paraît avoir aucune des réactions des stérols. Les teintes obtenues ne semblent dues qu'aux traces d'ergostérol ou de fongistérol que l'on n'arrive pas à éliminer totalement.

Il semble, et sa formule brute concorde avec cette manière de voir, que le zymostérol est un produit d'oxydation de l'ergostérol. Cependant, on n'obtient pas la réaction de Lifschütz par l'acide acétique et l'acide sulfurique, si caractéristique des oxystérols.

Il doit y avoir entre les trois stérols extraits de la

levure, plus qu'une isomérisie, mais des différences de structure moléculaire que l'étude systématique de ces corps à partir d'échantillons suffisants pourra permettre d'élucider.

## CHAPITRE III

### EFFETS PHOTOCIMIQUES

Dès 1924, Takahaschi avait signalé l'action des stérols irradiés sur la plaque photographique et sinon l'identité, du moins le parallélisme de cette action et du pouvoir antirachitique de ces mêmes stérols. Pour Wolmer et Reckling, cette action serait due à la formation d'eau oxygénée ; pour Avellar de Laureira, pour Stutesky, la production d'ozone en serait la cause.

Pour d'autres auteurs, le phénomène serait au moins en partie d'ordre physique. C'est ainsi que Serono et Cruto admettent pour les stérols le pouvoir de « fixer et d'émettre ensuite des radiations ultra-violettes ».

Pour J.-W. Woodrow qui a surtout étudié la photo-activité de l'huile de foie de morue et aussi son insaponifiable, l'explication purement chimique du phénomène ne serait pas satisfaisante.

En présence de ces divergences, nous avons voulu apporter notre contribution à l'étude du phéno-

mène en l'observant systématiquement pour tenter d'en fournir une explication.

Nous nous sommes demandé à la suite de ces chercheurs quelles modifications l'irradiation ou l'insolation pouvaient apporter dans l'édifice moléculaire des stérols et si ces altérations ne pouvaient pas être concomitantes d'une libération d'énergie.

Nous avons étudié sur la plaque photographique l'effet des divers échantillons de stérols que nous avons isolés. Soit une vingtaine. Nous avons opéré dans tous les cas, dans des conditions identiques, avec des plaques Lumière, étiquette violette. Les temps d'exposition ont été de quatre jours à la température du laboratoire, c'est-à-dire à 17° —18° et de vingt-quatre heures à 37°.

Il convient avant tout de mettre un premier point en lumière: aucun stérol, quelle que soit son origine, s'il a été extrait et conservé à l'obscurité ne présente d'action sur la plaque photographique, même s'il est laissé au contact direct de la gélatine. Mais si son extraction s'est effectuée à la lumière diffuse du laboratoire, ou s'il a été, après son isolement abandonné dans un flacon à ce même éclairage, surtout si le stérol n'occupait pas tout l'espace du flacon, son action se manifeste plus ou moins suivant l'intensité et le temps de l'éclairage auquel il a été soumis. Si on intensifie cette action de la lumière, soit par une exposition au soleil, soit plus encore en soumettant l'échantillon au rayonnement d'une lampe quartz-mercure, l'action sur la plaque est beaucoup plus marquée.

Dans les deux cas, elle tend vers un maximum qui nous a paru être :

1° Pour l'exposition au soleil sans autre interposition que l'air, de trois mois à l'époque de l'équinoxe de printemps à Lyon.

2° Pour l'exposition au rayonnement ultra-violet, d'une demi-heure pour une lampe Gallois du type K LW, pour courant alternatif, fonctionnant sous 120 volts et 5 ampères, l'échantillon de stérois étant irradié soit en solution dans l'alcool éthylique à 80°, soit en mince couche de cristaux à une distance de 60 centimètres de la source lumineuse, sans autre interposition que l'air.

Si l'on recouvre les cristallisoirs contenant les stérois d'une mince feuille de cellophane ou de collodion, l'action s'exerce tout aussi bien, mais le maximum n'est atteint que dans un temps plus long et qui est fonction de l'épaisseur de la membrane interposée.

L'exposition aux diverses sources lumineuses peut être effectuée soit à l'air libre, soit en atmosphère d'oxygène, soit dans un gaz inerte comme l'azote ou  $\text{CO}_2$ , sans rien changer à l'effet photo-actif, à condition toutefois que cette action sur la plaque s'effectue à l'air libre ou dans l'oxygène. Mais si l'on supprime ce dernier facteur, si par exemple on irradie des stérois en atmosphère d'azote ou de  $\text{CO}_2$  et qu'on dispose ces corps sur des plaques sensibles à l'abri de l'oxygène, l'action est considérablement diminuée dans son intensité.

Ces essais, d'une exécution particulièrement délicate, ont été faits dans les conditions suivantes :

Nous installions aussi rapidement que possible le dispositif de mise en présence des stérols et des plaques et nous enfermions le tout dans une cloche noire à deux tubulures, mise en place à la chambre noire. Un courant d'azote ou de  $\text{CO}_2$  était alors envoyé dans l'atmosphère de la cloche.

La mise en place et la sortie pour le développement des plaques, seules, s'effectuaient donc à l'air.

Dans ces conditions expérimentales aussi rigoureuses que possible, nous avons constaté que l'effet photo-actif était considérablement diminué. Si nous prenons comme unité d'intensité l'effet produit par un stérol en cristaux, irradié une demi-heure à l'air libre à l'aide d'une lampe Gallois KLW, à 60 centimètres, sur une plaque Lumière violette après quatre jours d'exposition, l'action de ce même stérol irradié, le même temps, et mis en place à l'abri de l'air pendant une durée égale sur une plaque identique a diminué dans le rapport d'environ 1 à 10

Nous avons voulu nous rendre compte si en raison de cette nécessité de la présence d'oxygène, les antioxydants pourraient jouer un rôle empêchant vis-à-vis de l'action photoactive des stérols. Nous avons irradié ces stérols en solution dans l'alcool à 80° dans lequel nous avons ajouté à 10 centimètres cubes de solution, trois gouttes d'essence de thérébenthine. Après irradiation, l'alcool était évaporé

dans le vide. L'effet tout en étant beaucoup moins intense est resté marqué.

Nous avons renouvelé l'expérience en ajoutant à la solution alcoolique une trace d'hydroquinone. Les résultats se sont montrés identiques à ceux obtenus avec l'essence de térébenthine. Dans les conditions où nous avons opéré, les antioxydants, tout en ralentissant considérablement l'effet photo-actif, ne l'anihilent pas complètement.

Cette action photo-active n'est pas indéfinie. Un stérol activé, s'il est placé à l'obscurité pendant au moins deux mois, perd son pouvoir d'impressionner la plaque. Il le récupère par une nouvelle irradiation ou une exposition à la lumière solaire. Cluzet et Kofman ont exposé les stérols à l'action des rayons X fournis par une ampoule Coolidge fonctionnant sous 20 centimètres d'étincelle et 2 m A. Le rayonnement total était filtré par une mince couche de papier carton pour supprimer l'action lumineuse ou calorifique du filament cathodique. Après l'irradiation évaluée à 5.000 R., les stérols se sont montrés actifs sur la plaque photographique dans les mêmes conditions que s'ils avaient été soumis à l'ultra-violet, mais avec une intensité un peu moins marquée.

Ces mêmes auteurs ont laissé des stérols dans une chambre noire au contact immédiat avec un appareil à sels collés de 10 milligrammes de bromure de Ra pendant soixante-douze heures. Ces corps acquièrent le pouvoir d'impressionner la plaque.

Nous avons, nous-même, fait un mélange de sté-

rols avec différents minerais radio-actifs en particulier, avec de la curite, de la masolite et de la pechblende provenant des mines du Haut-Katangua dans le Congo Belge.

L'activité de ces différents échantillons mesurée par M. Chevallier, pour le rayonnement  $\alpha$ , disque de 6 centimètres de diamètre, 1 gramme de minerai, a été trouvée pour :

|                         |      |
|-------------------------|------|
| La curite. . . . .      | =4,5 |
| La masolite .. . . .    | =3,6 |
| La pechblende . . . . . | =3,7 |

Nous avons broyé finement ces minerais. Leur mélange intime avec les stérols a été réalisé et nous les avons laissés en présence à la chambre noire pendant huit jours. Au bout de ce temps, nous avons épuisé le mélange à l'éther, d'où les stérols ont cristallisé.

Mis en place sur des plaques, ils se sont montrés actifs comme après l'exposition aux rayons ultraviolets, mais avec une moindre intensité.

Tous ces faits font bien ressortir l'action activante des rayons à courte longueur d'onde et à grande fréquence vibratoire.

Si on filtre le rayonnement de la lampe quartz-mercure à l'aide d'un écran au nickel (Lumière de Wood), on obtient encore un effet photo-actif, mais d'une intensité beaucoup moins marquée qu'en employant à l'irradiation, tout le spectre. Il faut avec la lumière de Wood un temps d'exposition à la lampe, vingt fois plus considérable si l'on veut obtenir

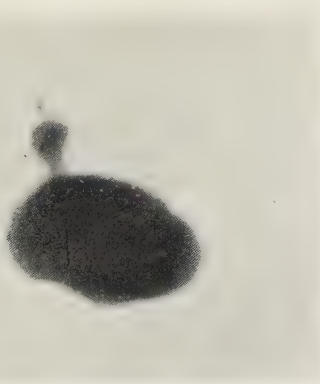
un effet d'intensité égal à celui obtenu avec le spectre total.

Ce sont les radiations de longueur d'onde autour de 3.000 UÅ qui paraissent provoquer un effet photo-actif maximum. On peut rapprocher ce fait de celui signalé par Fabre et Simonnet dans l'étude de l'activation de l'ergostérol en vue de son pouvoir antirachitique.

Enfin Cluzet et Kofman ont signalé l'effet antagoniste des rayons infra-rouges d'une part, des ultra-violets, des rayons X et des rayons  $\alpha$  d'autre part, sur l'action photo-active des stérols.

Il ressort de ces expériences que l'action photo-active des stérols exige pour s'exercer au moins deux facteurs :

- 1° Les radiations lumineuses à courtes longueurs d'onde ;
- 2° L'oxygène.



Cholestérol de morue au contact direct de la gélatine.

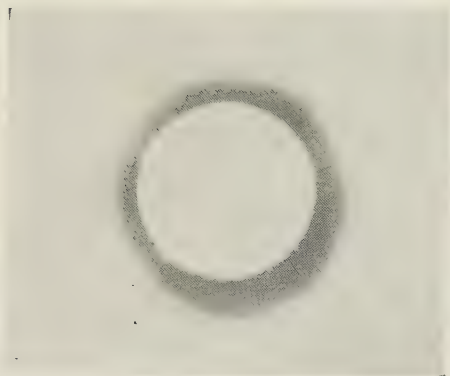


Ergostérol au contact direct de la gélatine.

Divers écrans empêchent cette action. L'interposition d'une lamelle de quartz ou de verre entre le stérol et la plaque sensible met celle-ci à l'abri sur une surface égale à celle de la lamelle. Mais tout autour, la gélatine sensible se montre impressionnée avec une intensité qui va décroissant des bords de la lamelle à la périphérie.



Lamelle de quartz



Lamelle de verre.

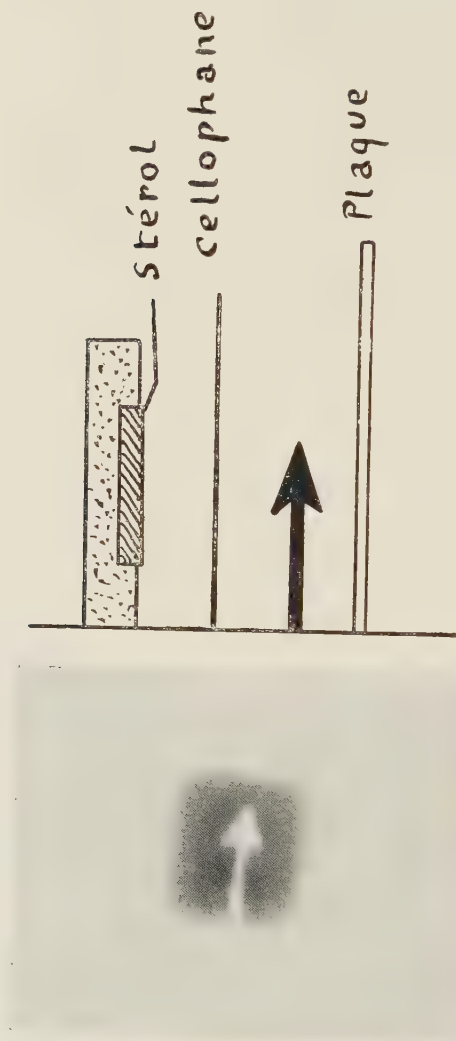
Si l'on interpose une mince feuille de cellophane, de collodion ou de papier transparent, l'action est diminuée dans ses effets, en raison directe de l'épaisseur de ces écrans, mais reste très marquée.

De plus, pour impressionner la plaque, le contact direct n'est pas nécessaire. L'action se produit à distance, soit en couvrant à l'aide d'une plaque sensible un cristalliseur, sur le fond duquel on avait disposé quelques cristaux de stérol activé, soit en plaçant en position verticale le stérol et la plaque, séparés par un intervalle qui variait dans nos expériences de 3 millimètres à 6 centimètres.

On peut, dans cette position, placer entre le stérol et la plaque un écran de cellophane, de collodion ou de papier, sans empêcher l'action.

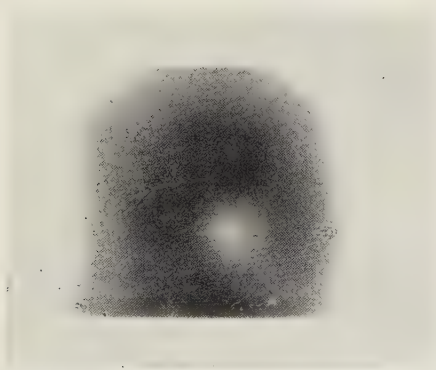
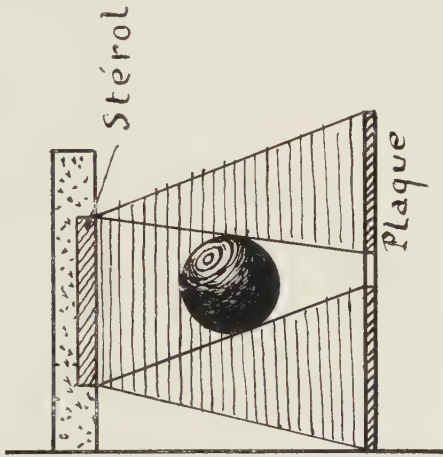
De plus, si on interpose un écran opaque, boule de verre noir, boule de plâtre, ou de liège, index d'aluminium ou de fer, etc. Ces dispositifs comme

le montrent les figures ci-jointes mettent en évidence l'existence d'une sorte d'ombre portée.

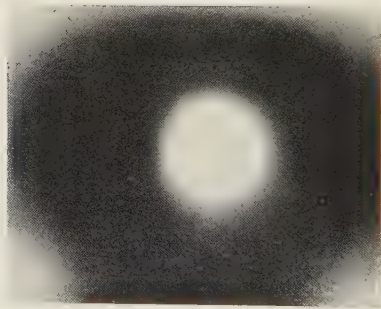
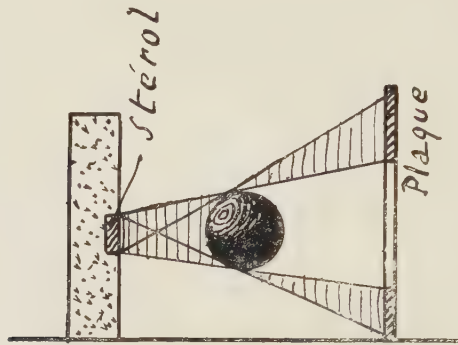


*Nota.* — Tous nos clichés reproduisent sur papier les négatifs des plaques.

Si l'on prend une sphère de verre, en l'espèce une épingle à tête noire, dont le diamètre est moindre que la cavité contenant le stérol, on obtient sur la plaque une ombre portée d'un diamètre inférieur à celui de la sphère. Ceci, comme l'indique la figure, est conforme à la marche des rayons, à supposer qu'il s'agisse d'un rayonnement. Mais ce fait n'exclut pas une action purement chimique qui aurait simplement été gênée par la sphère.



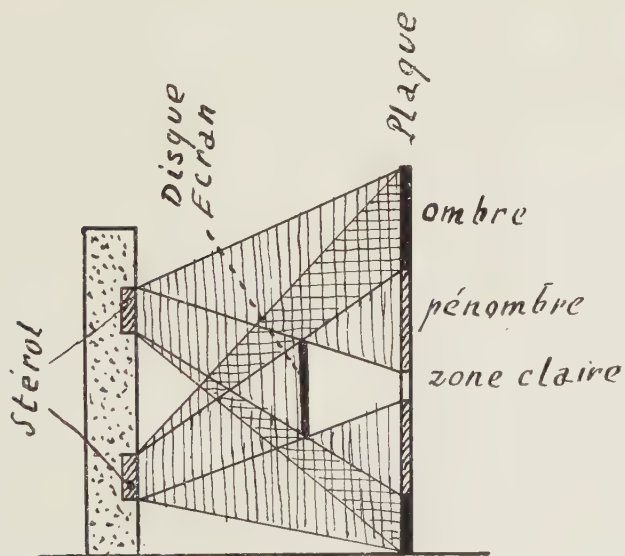
Mais si nous prenons une boule noire dont le diamètre est supérieur à la cavité contenant le stérol, l'ombre sur la plaque apparaît plus grande que la sphère.



Ici l'action chimique seule n'explique pas le phénomène, Et il semble qu'on puisse admettre un rayonnement.

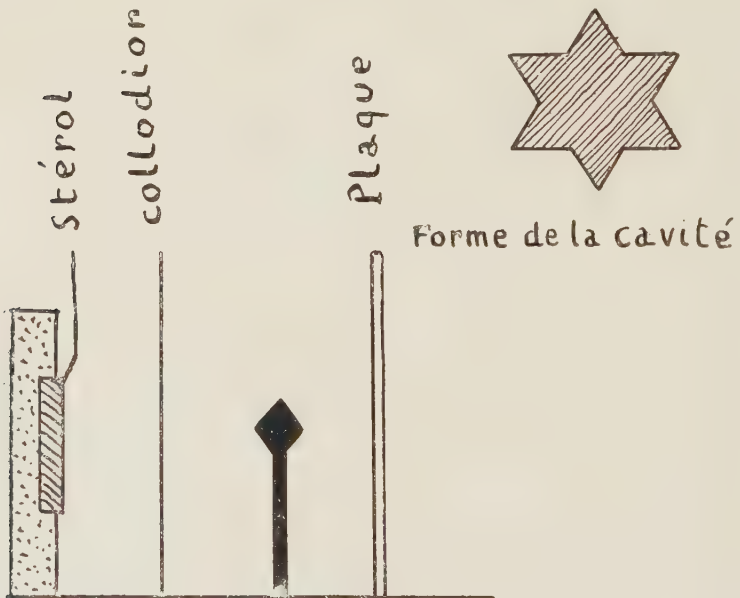
Pour tenter d'en avoir une preuve plus convaincante, nous avons pris deux sources en creusant deux cavités dans chacune desquelles étaient placés des stérols irradiés. Le dispositif était placé vertica-

lement ainsi que la plaque, distante de 3 centimètres. A 1 centimètre de celle-ci, entre elle et le stéril, nous avons disposé un écran métallique, sous forme d'une mince lame de zinc. Comme l'indique le schéma, la marche d'un rayonnement doit dans ces conditions donner au centre une zone claire d'une surface plus petite que celle de la lame écran. Tout autour de cette zone claire doit régner une zone de pénombre, enfin, plus à la périphérie une zone d'ombre au point de convergence des rayonnements des deux sources. C'est ce que nous a donné l'expérience, dont la figure exprime le résultat.

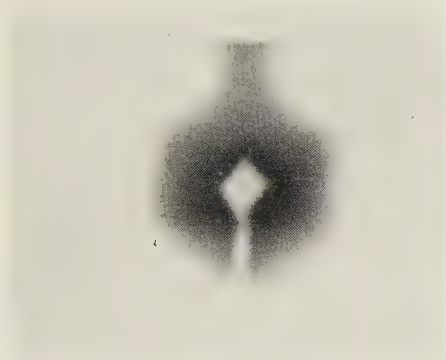




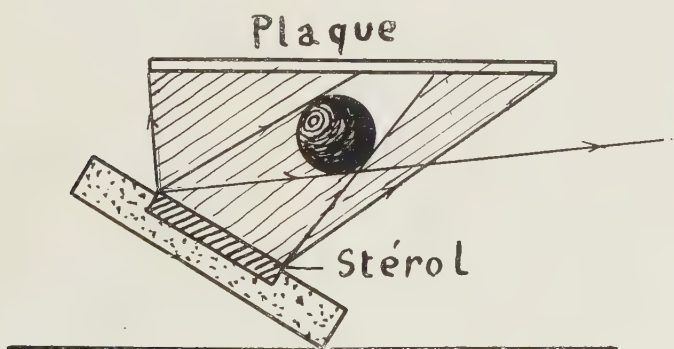
En plaçant verticalement un échantillon de stérol activé, dans une cavité de forme définie (carré, étoile, cercle) ménagée dans une lame de liège ou de plomb, à 3 centimètres de distance de la plaque, on obtient au développement, une image un peu floue, mais suffisamment nette des contours de la cavité.

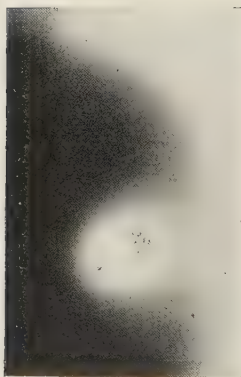


Des flèches métalliques interposées entre le stérol et la plaque forment ombre. Ces images sont, en tous cas, beaucoup plus nettes que s'il s'agissait d'un simple phénomène de diffusion.



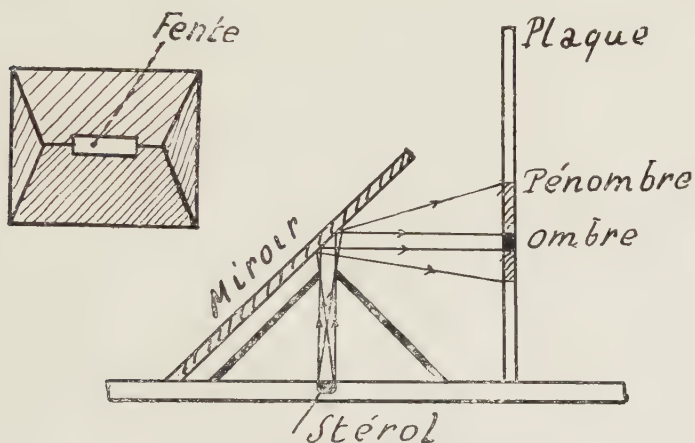
Si l'on dispose la cavité contenant le stérol de telle sorte qu'elle soit oblique par rapport à la plaque et qu'on interpose entre le stérol et la plaque une sphère comme l'indique le schéma ci-contre, on obtient de cette sphère une image déformée avec un cône de pénombre comme en rendent compte les clichés.





On peut même faire subir à l'agent photo-actif une réflexion sur un miroir ordinaire ou d'Ag poli. On place, comme le montre le schéma, le stérol dans une cavité de 2 millimètres de large sur 1 centimètre de long, ménagée au fond d'une petite boîte en laiton, de section triangulaire, dont deux faces forment, avec la base, un angle de  $45^{\circ}$ . L'arête su-

périeure porte une fente de même dimension que la cavité contenant le stérol. Grâce à ce dispositif, l'action du stérol sur la plaque ne peut s'exercer que par la fente. Le miroir, incliné à  $45^\circ$ , est disposé parallèlement à l'une des faces de la boîte, l'argenteure tournée du côté de la base où est disposé le stérol, la plaque photographique placée perpendiculairement au fond de la boîte comme le montre le schéma.



Le trajet d'un rayon direct, qui irait du stérol au miroir, s'y réfléchirait et irait à la plaque, est au total de 3 centimètres. Ce dispositif est mis en place à la chambre noire. Dans ces conditions, au bout de quatre jours, la plaque est impressionnée au point prévu par le calcul. De plus, on constate, au centre, une zone d'ombre entourée d'une zone de pénombre comme le laissait prévoir la marche d'un rayonnement.

Pour tenter d'éliminer l'action chimique causée par un produit volatil, nous avons renouvelé plusieurs de ces expériences, en faisant passer un courant d'air dans une cloche à deux tubulures, jouant le rôle de chambre noire et où le dispositif était mis en place. Une des tubulures était laissée en relation avec l'atmosphère de la chambre noire, à l'autre, on adaptait un caoutchouc relié à une trompe.

Dans ces conditions, les résultats obtenus ont été sensiblement les mêmes quoique plus flous ; même s'il ne s'agit que de produits volatils, ceux-ci sont donc très faiblement déviés par un courant d'air.

Ces expériences, plusieurs fois répétées, nous incitaient à penser que nous pouvions être en présence d'un phénomène d'ordre physique, mettant en jeu de l'énergie électrique résultant d'une ionisation. Un premier essai, pratiqué par M. Chevallier, a démontré que s'il existait une ionisation, elle ne provoquait qu'un courant inférieur à  $10^{-13}$  ampères, limite de l'électromètre de Cheneveau et Laborde, utilisé pour cette détermination.

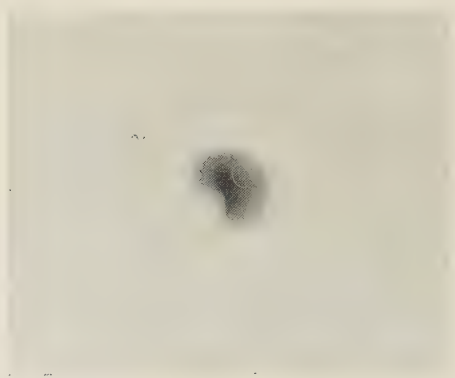
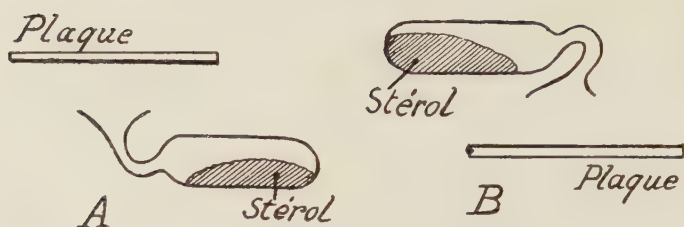
Un deuxième essai a été effectué par M. le pro-

fesseur Boutaric, en collaboration avec Mlle Roy, à l'aide de l'électromètre particulièrement sensible de Szilar. La déperdition de l'électromètre s'est montrée extrêmement faible, bien que pas absolument nulle.

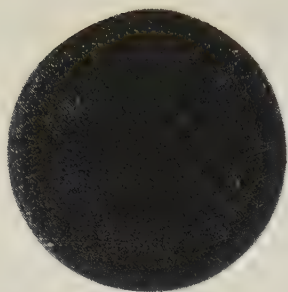
Pour 2 grammes d'ergostérol irradiés en cristaux, une demi-heure à l'air libre, la décharge s'est montrée à peu près comparable à celle que donne 2 grammes de KCl. Ce n'est pas là une action ionisante appréciable.

Restait à démontrer la réalité d'une action d'ordre chimique dans ce phénomène.

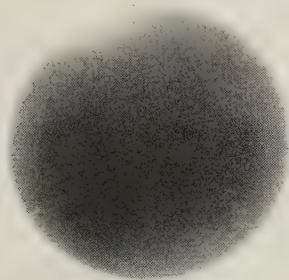
Pour la mettre en évidence, nous avons introduit des stérols irradiés dont l'effet photo-actif avait été contrôlé, dans des ampoules de verre fermées à l'une des extrémités, s'ouvrant à l'autre par un orifice évasé, relié à l'intérieur de l'ampoule par un tube contourné en col de cygne, empêchant toute action directe d'un rayonnement possible. A 2 centimètres de l'orifice, dirigé vers le haut ou vers le bas, on plaçait une plaque sensible. Le tout était enfermé dans une boîte métallique hermétiquement close, formant chambre noire. Après quatre jours d'exposition, la plaque était impressionnée au niveau de l'orifice de la tubulure, mais plus nettement quand elle était située en contrebas de l'ampoule, c'est-à-dire en position B au lieu de A, ce qui démontre qu'il s'agit d'un produit lourd.



De plus, nous avons sensibilisé nos plaques aux rayons ultra-violets en les plongeant pendant quelques secondes dans un bain constitué d'une solution à 2 ‰ d'huile minérale, un peu fluorescente (huile de machine à coudre), dans l'éther de pétrole bouillant au-dessous de 40°. La plaque est aussitôt séchée vigoureusement. Au moment du développement on désensibilise les plaques par un court lavage à l'éther de pétrole. Dans ces conditions, l'effet photochimique des stérols, tout en restant très net sur la plaque sensibilisée, s'est montré plus marqué pour la plaque non sensibilisée.



Plaque non sensibilisée aux rayons U. V.



Plaque sensibilisée aux rayons U. V.

Ces phénomènes de photo-activité deviennent plus marqués quand on opère à des températures supérieures à la température ordinaire, avec un maximum vers  $40^{\circ}$ . Ils se produisent dans ces conditions beaucoup plus rapidement.

Tous ces faits concordant pour démontrer l'intervention d'une réaction d'ordre chimique, nous nous sommes attachés à en donner la démonstration. Pour cela, nous avons dirigé sur de l'ergostérol

activé, extrait de la levure de bière, un courant d'air qui avait traversé au préalable une solution d'iode de K dans  $\text{SO}^4\text{H}^2$  à 15 % (réactif de Kingzett). A la suite du récipient contenant l'ergostérol, et séparé de lui par un tampon de laine de verre et de coton, avait été disposé un barboteur contenant ce même réactif de Kingzett. Après une heure de passage, le témoin n'ayant subi aucune modification, le réactif placé après le stérol a permis de déceler la présence de l'iode libéré. Si, plus simplement dans deux verres de montre placés côte à côte, sur une feuille de papier blanc, on dispose le réactif de Kingzett et qu'on ajoute à l'un d'eux un peu d'ergostérol activé, au bout de très peu de temps, l'iode libéré vient dessiner autour du verre contenant les stérols, un cercle brun, tandis que le pourtour de l'autre verre reste blanc.

De même, en traitant une solution de ferri-cyanure de potassium additionnée d'une goutte de chlorure ferrique, on voit le liquide se colorer nettement en bleu par addition de quelques gouttes d'eau dans laquelle on a fait bouillir une minute, l'ergostérol. De même, au contact d'une parcelle de stérol activé le réactif se colore en bleu de Prusse.

Si l'on prépare le leuco-dérivé du bleu de méthylène et qu'on y ajoute une trace d'ergostérol irradié, le réactif passe très rapidement au bleu.

— *Essai à l'acide titanique.*

D'après Treadwell, on obtient le réactif nécessaire en fondant une partie de bioxyde de titane du

commerce avec quinze ou vingt parties de pyrosulfate de potassium et en dissolvant le produit fondu dans  $\text{SO}^1\text{H}^2$  étendu, après refroidissement. Ce réactif doit se colorer en jaune par des traces d'eau oxygénée.

Or, si on fait bouillir une minute l'ergostérol irradié avec de la lessive de soude étendue et qu'on ajoute le réactif précédent, celui-ci ne tarde pas à se colorer en jaune pâle.

— *Essai à l'acide vanadique.*

D'après Jôrisson, pour préparer ce réactif, on chauffe au bain-marie 0, 1 gramme d'anhydride vanadique et 2 centimètres cubes  $\text{SO}^1\text{H}^2$  concentré, on ajoute un peu d'eau et l'on décante dans un petit ballon de 50 centimètres cubes, on complète avec de l'eau. La liqueur bleue verdâtre est colorée en rose, rouge ou brun par les peroxydes.

Avec l'ergostérol irradié ajouté directement au réactif, nous avons obtenu une teinte rose très nette.

Ces réactions étant également obtenues avec les peroxydes, l'eau oxygénée et les ozonides, il est difficile de différencier l'un de ces corps.

L'essai à l'acide chromique en présence d'éther a été négatif. Or, les peroxydes, substances plus stables, ne donnent pas cette réaction, mais elle n'est différencielle que si on est en présence de solution aqueuse. Or, les stérols sont insolubles dans l'eau.

Pour Clôver et Richmond, les peroxydes ne don-

neraient pas les réactions à l'acide titanique et à l'acide vanadique. Les colorations observées seraient dues à une formation secondaire d'eau oxygénée. Nous avons tenté un dosage d'O actif, par le titrage à l'hyposulfite de soude de l'iode libéré de KI par le peroxyde en solution acide. Mais l'insolubilité du stérol d'une part, et la faible quantité de matière dont nous disposions d'autre part, ne nous ont pas donné de résultat décisif.

La distinction d'avec les ozonides est encore plus difficile. Des solutions acides aqueuses excluent en général la présence d'ozonides, car ceux-ci sont presque tous insolubles dans l'eau. Or, le produit de l'irradiation de l'ergostérol est insoluble dans les acides dilués. Sans pouvoir affirmer la formation d'un ozonide, c'est cette combinaison qu'il nous semble le plus logique d'admettre.

On connaît des dérivés benzéniques, à chaîne latérale non saturée comme le phénylbutène qui ne fixent de l'ozone qu'à la liaison éthylénique.

Si l'on suppose la formation d'un ozonide, l'hydrolyse de ce composé doit libérer un tronçon aldéhydique ou cétonique qui serait actif sur le bromure d'argent. Nous nous sommes attachés à en démontrer la présence par toutes les réactions qui étaient à notre usage.

En premier lieu, nous nous sommes adressés au réactif de Schiff. On sait que la fuchsine décolorée par l'acide sulfureux est instantanément recolorée par les aldéhydes et prend une teinte variant du rouge au violet.

Nous avons disposé dans un barboteur l'ergostérol irradié en poudre et, dans un deuxième barboteur isolé du premier par du coton, nous avons placé le réactif de Schiff. En adaptant le système à une trompe, nous avons fait passer lentement de l'air, et le réactif s'est nettement recoloré, d'abord dans le tube d'arrivée, sous forme d'un anneau violet, puis dans toute la masse. Un essai témoin sans stérol, n'avait rien donné dans le même temps.

Dans les mêmes conditions, mais en substituant au réactif de Schiff l'azotate d'argent ammoniacal et en opérant à l'obscurité, nous avons obtenu à froid, en deux heures, un précipité d'argent.

Ces deux réactifs, si on les ajoute dans des verres de montre, à la poudre d'ergostérol irradié, donnent également une réaction positive. De même avec l'eau de lavage de cet ergostérol, si à une solution de permanganate de potasse on ajoute l'ergostérol irradié en cristaux, la teinte disparaît en une demi-heure.

Si à une solution alcoolique de résorcine contenant une trace d'acide chlorhydrique, on ajoute quelques gouttes de la solution alcoolique d'ergostérol irradié et qu'on fasse bouillir une minute, en versant alors le produit dans l'eau, on obtient un précipité, caractéristique du groupement aldéhyde.

Si à de l'acide diazobenzène sulfonique pur dissout dans 60 parties environ d'eau froide contenant un peu de lessive de soude, on ajoute de l'ergostérol irradié mélangé à de la soude étendue, puis un peu d'amalgame de sodium, on obtient à froid,

au bout de vingt à trente minutes, une coloration rouge violacée. Cette réaction est une des plus sensibles du groupe aldéhydique.

Par contre, la réaction de Feder au chlorure mercurique, sulfite de soude et soude caustique s'est montrée négative, mais elle n'est sensible qu'à 0,05 milligrammes d'aldéhyde formique.

Si, à du chlorhydrate de semicarbazide dissous dans un peu d'eau additionné de la quantité correspondante d'une solution alcoolique d'acétate de potassium, puis d'alcool et d'eau, on ajoute une solution alcoolique d'ergostérol irradié, on obtient bien au bout de quatre jours, un corps cristallisé, mais en si faible quantité qu'il nous a été impossible de l'isoler pour prendre un point de fusion.

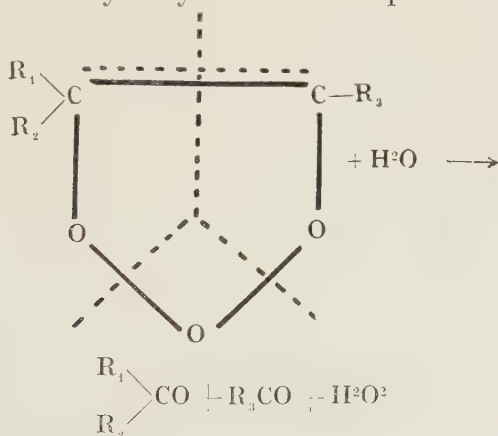
Enfin, si à de la liqueur de Fehling fraîchement préparée, on ajoute quelques cristaux d'ergostérol irradié, on constate à froid un changement de coloration, le bleu de la liqueur diminuant d'intensité. Puis à l'ébullition, la teinte passe au vert d'abord franc, puis au vert sale et si on laisse reposer le tube quelques heures, on voit nettement au fond, un dépôt d'oxyde de cuivre rouge.

En résumé, la plupart des réactions du groupe aldéhydique se sont montrées positives et, en particulier, les plus sensibles, en raison de la petite quantité de matière employée. Par contre, aucune des réactions soit des peroxydes, soit des aldéhydes n'a donné de résultat avec l'ergostérol initial avant toute irradiation. C'est donc l'action du rayonne-

ment ultra-violet qui a fait naître dans la molécule ces fonctions nouvelles.

De plus, l'ergostérol seul a fourni, après irradiation, ces résultats positifs de façon particulièrement nette. Le cholestérol d'huile de foie de morue irradié, les donne encore, mais à un degré beaucoup moins marqué. Le cholestérol de sang de bœuf ne donne que celle de Kingzett pour les peroxydes, celle de Schiff et celle à l'acide diazobenzène sulfurique pour les aldéhydes.

En présence des résultats positifs de ces trois ordres de réactions: oxygène peroxydique, aldéhydes, eau oxygénée, on était en droit de penser à un ozonide. Le schéma ci-joint rend compte du mécanisme habituel de l'hydrolyse de ces composés.



Sur quelle double liaison de la molécule stéroli- que peut se constituer cet ozonide. Il est actuelle- ment impossible de l'établir.

Avec la collaboration éclairée de M. Dœuvre, nous avons tenté d'appliquer aux stérols irradiés la

méthode qu'il a mise au point avec M. Grignard pour doser les corps qui ont pris naissance dans l'hydrolyse des ozonides.

Nous espérons de cette manière mettre en évidence la position de la double liaison, au bout de la chaîne longue de l'ergostérol, qui pour Windaus est terminé par un groupement vinylique.

Nous espérons ainsi doser l'aldéhyde formique, colorimétriquement au moyen du réactif de Grosse-Bolle, par comparaison avec des types à teneur connue en aldéhyde formique. Ce réactif ne donne, en présence de HCl, une coloration rouge violacée qu'avec l'aldéhyde formique. Le réactif est préparé de la manière suivante :

1 gramme de chlorhydrate de rosaniline est dissous dans 500 centimètres cubes d'eau, cette solution est additionnée de 25 grammes de sulfite de soude cristallisé préalablement dissous, puis de 15 centimètres cubes de HCl ( $d = 1,112$ ). On complète à un litre. Après un ou deux jours, il est obtenu un liquide à peine coloré en jaune qui est prêt à servir après filtration.

Cette réaction nous a permis d'identifier de façon très nette la présence d'aldéhyde formique, ce qui tendrait à prouver la formation d'un ozonide en bout de chaîne, donc la présence d'un groupe vinyl. Nous n'avons pu effectuer le dosage à cause d'une difficulté de technique. La méthode marche bien quand le corps est en solution dans l'acide acétique. Or, la solubilité de l'ergostérol dans cet acide s'est

montré insuffisante pour permettre la concentration nécessaire au dosage.

Dans l'hydrolyse de l'ozonide, la présence d'eau oxygénée agit sur l'aldéhyde formique en donnant de l'acide formique que l'on peut caractériser par une réaction signalée depuis longtemps par Liebig. L'acide formique chauffé à l'ébullition avec  $\text{HgO}$  rouge est complètement transformé en  $\text{CO}^2$ . La caractérisation du gaz carbonique dégagé dans cette opération, se fait par barbottage dans l'eau de baryte. L'acide acétique est stable dans ces conditions. Ici encore, nous n'avons pu que caractériser  $\text{CO}^2$  sans pouvoir le doser.

Dans cette action sur la plaque sensible, la fonction alcool du stérol ne semble jouer aucun rôle. Nous avons essayé à partir de l'acétate et du chlorhydrate de divers échantillons actifs, sans obtenir la moindre diminution d'activité.

Dans cette étude sur la photo-activité des stérols, nos essais ont porté sur :

- l'ergostérol d'ergot de seigle,
- l'ergostérol de levure,
- le zymostérol,
- le stérol d'huile de foie de morue,
- le stérol de sang de bœuf,
- le stérol d'escargot,
- le stérol de *Bombyx mori*,
- le stérol de cerveau humain (femme) (substance grise, substance blanche),
- le stérol de cerveau de bœuf,
- le stérol d'huile d'œufs,

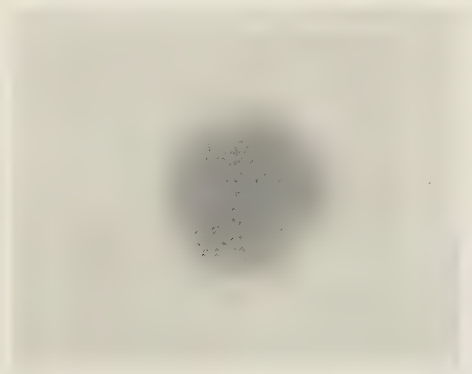
- le stérol de harengs frais et saurs,
- le stérol d'organes génitaux de harengs frais,
- le stérol des calculs biliaires,
- le stérol de squames de psoriasis.

Seuls les stérols d'ergot, de levure, de sang de bœuf, d'escargot, de Bombyx et de substance grise de cerveau humain se sont montrés actifs sur le bromure d'argent de la plaque sensible après exposition d'un mois à l'air et au soleil sous une mince membrane de cellophane. L'irradiation d'une demi-heure d'une solution dans l'alcool à 95° à 60 centimètres de la lampe Gallois n'a activé que l'ergostérol, le stérol d'huile de foie de morue et celui de sang de bœuf. Une irradiation plus prolongée (une à trois heures) a activé tous les autres stérols, sauf ceux extraits des harengs, de l'huile d'œuf préparée depuis vingt-cinq ans, des calculs biliaires et des squames psoriasiques.

En raison du fait, qu'on tend à rapporter l'action de l'héliothérapie ou de la cure d'actinothérapie aux stérols de la peau, nous avons voulu essayer l'action de ces stérols irradiés sur la plaque sensible. Nous nous sommes adressé en premier lieu au cholestérol extrait des squames de psoriasis où ce corps est en abondance telle qu'il semble constituer la totalité de ces squames, qui donnent directement avec intensité, les réactions de Liebermann et de Salkowsky. Comme nous l'avons signalé plus haut, ce stérol n'a montré aucune activité ni après une longue insolation, ni à la suite d'une irradiation qui a varié d'une demi-heure à dix-huit heures. C'est

done bien là un cholestérol d'excrétion, un déchet comme celui extrait à partir des calculs biliaires.

En second lieu, nous avons voulu essayer l'action des stérols de la peau *in situ*. Pour ce faire, nous nous sommes irradié la jambe par des séances progressivement croissantes, débutant par dix minutes et allant jusqu'à deux heures pendant huit jours. Nous avons alors disposé sur la peau une pellicule photographique, la gélatine sensible tournée en dehors, et à l'aide de papier d'étain et d'un pansement noir occlusif, nous avons isolé la pellicule de toute lumière. Un cache, de forme définie, avait été ménagé entre la peau et la pellicule pour apprécier l'intensité en cas d'action. Le dispositif est resté six jours en place. Au développement, nous avons constaté une zone de pénombre assez nettement marquée dans l'espace laissé libre par le cache, or, la pellicule est beaucoup moins rapide que la plaque violette ; d'autre part, l'épaisseur du film constitue un écran assez important. Les stérols.



de la peau présentent donc après irradiation une activité marquée.

De tous les stérols actifs, c'est l'ergostérol qui s'est montré constamment le plus actif. De plus, c'est lui seul qui a donné toutes les réactions des peroxydes ou des aldéhydes de façon nette et constante. Les autres stérols ne semblent donc agir qu'autant qu'ils sont accompagnés de traces d'ergostérol. C'est une constatation faite déjà au sujet du traitement du rachitisme. La molécule du cholestérol est peut-être inactive. Sa double liaison cyclique n'aurait pas une labilité suffisante pour permettre la formation de l'ozonide à partir de l'irradiation. Au contraire, l'ergostérol présentant trois doubles liaisons, dont une en bout de la chaîne latérale, serait plus susceptible de donner des composés instables, dont la coupure libérerait des produits actifs.

Les phénomènes que nous venons de décrire ne sont d'ailleurs pas spéciaux au groupe des stérols. Nous les avons observés avec des échantillons d'indol et de scatol exposés à l'air et à la lumière, derrière une fenêtre bien éclairée, sous une mince membrane de cellophane. Ces deux corps deviennent photo-actifs et subissent une résinification, les deux phénomènes paraissent corrélatifs l'un de l'autre. L'irradiation de ces deux corps conduit au même résultat. Mais, leur étude sortant du cadre que nous nous sommes tracé, nous nous contenterons ici de signaler le fait.

## CONCLUSIONS

Il résulte de nos recherches que :

1° Certains stérols et en particulier ceux de levure, d'ergot, d'huile de foie de morue, de sang, d'escargot, de bombyx mori acquièrent à l'air et à la lumière, ou après irradiation à l'aide d'une lampe à mercure, la propriété d'impressionner la plaque photographique.

2° Ils perdent cette photo-activité quand ils sont soustraits pendant deux mois à l'action de la lumière ;

3° Dans ce phénomène interviennent des réactions chimiques : production d'oxygène actif et d'aldéhyde. Il y a tout lieu de penser à la formation d'un peroxyde, probablement d'un ozonide.

4° L'élément photo-actif dégagé par les stérols, a les caractères d'un produit volatil, lourd, qui se comporte vis-à-vis de certains obstacles à sa diffusion, comme un agent physique.

*Du reste, l'intervention dans ces phénomènes d'un agent physique n'est peut-être pas exclue.*

5° Ces actions paraissent ressortir au seul ergostérol. Les autres stérols ne seraient actifs qu'autant qu'ils seraient accompagnés de traces d'ergostérol.

6° La photo-activité de certains stérols ne leur est pas spéciale. En se résinifiant à l'air et à la lumière, l'indol et le scatol la présentent également.



## CHAPITRE IV

### OXYDATION DES HUILES EN PRÉSENCE DES STÉROLS IRRADIÉS DE DIVERSES ORIGINES

Les recherches que nous avons poursuivies sur l'effet photo-chimique des stérols activés, sur la plaque photographique, nous ayant permis de caractériser la présence de tronçons aldéhydiques provenant vraisemblablement de la rupture d'un ozonide, ainsi que celle d'oxygène peroxydique, nous nous sommes demandés si en libérant ces différents produits dont l'effet oxydo-réducteur est particulièrement marqué, les stérols irradiés ne joueraient pas, sous certaines conditions, le rôle de catalyseurs d'oxydation.

Si, en d'autres termes, les stérols activés par les rayons à courte longueur d'onde ne seraient pas comparables par exemple à l'agent catalytique de la condensation de l'acroléine en résine, agent que Moureu a démontré être un peroxyde.

Nos premiers essais dans cet ordre ont porté sur les glucides.

Nous avons disposé dans le fond d'un Erlenmeyer en pyrex, de 300 centimètres cubes, une pâte constituée de :

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Glucose . . . . .             | 10 gr.   |
| Ergostérol irradié. . . . .   | 0 gr. 10 |
| Eau, Q. S. pour pâte épaisse. |          |

L'eau avait été stérilisée par une ébullition de trente minutes. La réaction du milieu était rendue nettement alcaline au tournesol par du carbonate de soude. Un papier de tournesol témoin trempé dans le mélange était gardé à part. L'Erlenmeyer était fermé par un bouchon percé de deux tubulures. L'une d'elle était reliée par un caoutchouc à un barboteur de Cloes, contenant de l'eau de chaux, barboteur I, précédé lui-même d'une colonne de ponce potassique et d'un flacon d'acide sulfurique. L'autre tubulure était mise en communication avec un barboteur de Cloes contenant de l'eau de chaux, barboteur II, et relié à une trompe à eau. On obtenait en réglant la trompe un débit de 100 bulles à la minute.

Au bout de trois heures, tandis que l'eau de chaux du barboteur I était restée limpide, prouvant ainsi que tout le  $\text{CO}_2$  atmosphérique était arrêté par la colonne de ponce potassique, l'eau de chaux du barboteur II était nettement troublée. De l'acide carbonique s'était donc dégagé du mélange (glucose+stérol). Une expérience témoin avec du glucose, sans stérol pendant le même temps et au même régime de bulles d'air, ne donnait aucun trouble.

En raison d'une action fermentative possible, nous avons renouvelé l'expérience aseptiquement. Tous nos vases avaient été préalablement stérilisés à 120°. Nous avons fait le mélange glucose+stérol irradié avec de l'eau bi-distillée stérilisée conservée en ampoules scellées. Ce mélange a été introduit dans un barboteur de Cloes en pyrex, stérilisé, et les tubulures ont été garnies de coton stérilisé. Le tout a été en plus tyndallisé à 60° pendant une heure, à vingt-quatre heures d'intervalle et trois jours de suite. Pendant les intervalles de vingt-quatre heures, le barboteur était placé à l'étuve à 37°. Un tube plein de coton stérilisé a été interposé entre le barboteur I et celui contenant le mélange glucose-stérol.

Pour activer la réaction, le mélange était plongé dans un bain-marie à 37°.

Dans ces conditions, nous avons constaté encore que seul le barboteur II voyait son contenu se troubler au bout de trois heures. Après vingt-quatre heures, on arrête le passage de l'air. On constate que les fragments de papier de tournesol bleus plongeant dans le mélange sont roses, tandis que les témoins sont restés bleus.

On prélève le contenu du barboteur central, on l'acidifie par HCl dilué et bouilli, puis on met à évaporer dans le vide sulfurique, en présence de potasse caustique. Au bout de quatre jours de vide, le contenu du cristalliseur se présente sous l'aspect d'un sirop jaune ambré, très épais, enrobant des cristaux. On broie ces cristaux avec du verre pilé

et on épuise le mélange par l'éther à 66°, parfaitement anhydre, conservé sur du sodium. L'éther évaporé laisse une laque, qui, reprise par l'eau, donne un liquide très acide au tournesol; or, cet acide n'est pas HCl, dont toutes les réactions sont négatives.

Le liquide ne réduit pas la liqueur de Fehling.

La réaction de la naphto-résorcine est nettement positive, démontrant la présence d'acide glucuronique.

On ne peut déceler par aucune réaction la présence d'acide oxalique, d'acide pyruvique, d'acide lactique ou d'acide butyrique.

Cet essai nous permettant de constater un début d'oxydation du glucose, nous avons fait une expérience témoin dans les mêmes conditions de réaction, de concentration, de temps, de rythme des bulles d'air et de température, mais sans ajouter de stérols irradiés à la solution de glucose. Dans cet essai témoin, le milieu, d'alcalin qu'il était au début, est devenu légèrement acide au tournesol à la fin de l'expérience, mais le contenu du barboteur II ne s'est pas troublé.

Quant à l'évaporation dans le vide de la solution de glucose acidifiée par HCl, elle n'a donné aucun sirop. La réaction à la naphto-résorcine s'est montrée négative.

Toutefois, en raison de l'insolubilité des stérols dans les milieux aqueux, nous avons voulu réaliser une expérience dans des conditions meilleures en tâchant d'obtenir des suspensions colloïdales de

stérols. Nous avons, pour ce faire, employé la technique suivante :

L'ergostérol irradié a été stabilisé à l'état colloïdal par agitation avec un autre colloïde, en l'espèce, le glycogène.

On opère, non pas par double décomposition, mais par double précipitation. Ce n'est donc pas une réaction chimique, mais une réaction uniquement colloïdale.

a) solution alcoolique d'ergostérol + Eau  $\longrightarrow$   
Ergostérol précipité

b) solution aqueuse de glycogène + alcool  $\longrightarrow$   
glycogène précipité.

On combine les deux temps.

Dans 10 centimètres cubes d'alcool à 95°, contenant 0 gr. 10 de stérol, on verse goutte à goutte en agitant sans cesse et à froid 10 centimètres cubes de solution aqueuse de glycogène à 10 pour 100. On agite énergiquement et on complète à 100 centimètres cubes avec de l'eau distillée. On filtre ; on a ainsi un colloïde d'ergostérol assez stable. Mais il est impossible de stériliser les solutions ainsi préparées sous peine de floculation importante. Nous avons dû les préparer aseptiquement dans des vases stérilisés et à partir de produits eux-mêmes stérilisés.

Nous ne pouvons pas affirmer dans ces conditions qu'au cours des diverses manipulations nous n'avons pas introduit de germes microbiens. Les résultats ne s'étant pas montrés concordants au cours

de trois essais consécutifs, nous avons dû abandonner la méthode.

#### EXPÉRIENCES SUR LES HUILES :

Nous nous sommes donc, dans une deuxième série d'expériences, adressé aux lipides, en raison de la solubilité des stérols dans cette classe de corps organiques. Nous avons choisi deux huiles particulièrement siccatives, l'huile de lin et l'huile de foie de morue.

Trois techniques ont été essayées :

1<sup>o</sup> Par barbotage. Les résultats se sont montrés incertains parce qu'il est difficile d'assurer un courant d'oxygène rigoureusement égal dans les témoins et dans les autres. Il suffit d'intervertir les positions pour voir varier les résultats.

2<sup>o</sup> Nous avons fait une solution de linoléate de soude à 5 % dans laquelle ont été versés 10 centimètres cubes d'une solution acétonique renfermant 0 gr. 20 de stérol irradié. Il ne s'est formé aucune précipitation.

L'acétone a été évaporée dans le vide.

Dans la solution colloïdale de savons + stérol + trace de  $MnCl_2$ , nous avons fait barboter l'oxygène. L'oxydation a été jugée en acidifiant et en épuisant les acides gras par l'éther, dessiccation dans le vide et indice d'iode. La même opération a été effectuée sur le témoin à même  $P_H$ . Pour éviter que l'indice d'iode ne soit modifié par le stérol lui-même,

nous avons ajouté un lait de chaux pour précipiter les savons, épuisé à l'acétone qui dissout le stérol, et réépuisé une deuxième fois à l'éther en milieu acide pour séparer les acides gras des savons calciques.

Nos résultats, pas plus que pour la méthode par barbotage, ne se sont pas montrés constants.

3<sup>o</sup> Méthode statique en cristallisation. Son seul inconvénient est sa durée, mais elle marche très bien.

Nous avons préféré, pour la mesure de l'oxydabilité, employer la méthode pondérale, ayant à notre disposition une balance de Sartorius sensible au 1/10<sup>e</sup> de milligramme. Elle a, sur les autres mesures, l'avantage d'être simple, moins sujette aux erreurs.

Comme autre conséquence de l'oxydation on a signalé :

1. La diminution de l'indice d'iode.
2. L'augmentation de l'indice de saponification.
3. L'augmentation de l'indice d'acide.
4. L'augmentation de l'indice de viscosité.
5. La formation de produits volatils.

La méthode pondérale a l'avantage sur toutes les autres de ne nécessiter aucun prélèvement au cours de l'expérience et d'observer ainsi le phénomène sans faire varier les proportions.

Mais la formation de produits volatils se manifestant par une perte de poids, les chiffres obtenus traduisent donc en valeur absolue la différence

entre la prise de poids par oxydation et la perte de poids par formation de matières volatiles. Les gains constatés sont donc des gains minima inférieurs aux gains absolus. Cette perte de poids l'emporte pendant les premiers jours et s'est montrée constante pour un même échantillon d'huile, dans des conditions identiques. Nos courbes n'en tiennent pas compte et ne traduisent que les gains qui se manifestent en moyenne à partir du cinquième jour pour les huiles soumises à l'oxydation, à la pression atmosphérique. Nous verrons qu'au contraire les pertes de poids sont différentes, suivant qu'une huile est ou non stérolée, si on soumet cette huile au vide.

Nos essais ont tous été faits sur des quantités d'huile égales, dans des cristallisoirs en pyrex, identiques, d'un diamètre de 5 centimètres, à la température de  $17^{\circ}$  —  $18^{\circ}$  et à la pression atmosphérique. Chaque prise d'essai était de 20 grammes. On y ajoutait XX gouttes de la solution de stérol à 1 % dans l'huile étudiée. Nous n'avons pas ajouté d'autre catalyseur d'oxydation, tel que le borate de manganèse, ou le chlorure de magnésium, pour ne pas compliquer le phénomène et pour pouvoir être sûr de rapporter au seul stérol l'effet oxydant.

Les cristallisoirs étaient placés dans une cloche à deux tubulures dans laquelle arrivait l'O<sup>2</sup> d'une bombe. Les pesées étaient faites tous les deux jours dans des conditions identiques, au 1/10<sup>e</sup> de milligramme. La durée de chaque essai a porté sur trente jours.

Dans un premier groupe d'expériences, nous avons opéré à la lumière diffuse du laboratoire, sur une période allant du mois de décembre au mois de février. Pendant cette même période, un deuxième groupe d'essais était effectué à l'obscurité complète, toutes choses égales d'ailleurs. Nous avons opéré sur un même échantillon d'huile de lin crue, fournie par la Pharmacie Centrale, ainsi que sur un même échantillon d'huile de foie de morue, marque Riche, préparée à Saint-Pierre et Miquelon, à partir de foies frais, par entraînement à la vapeur d'eau.

Nous avons pris des stérols d'origines diverses, tous extraits par nous. Nous les avons irradiés à l'état de couche mince de cristaux, au laboratoire, à l'aide d'une lampe Gallois, type KLW; distance 60 centimètres, à l'air libre, sans filtrer la radiation.

## ETUDE DE L'HUILE DE LIN.

### I. *Oxydation de l'huile de lin en présence des stérols.*

Première série d'essais effectués à la lumière diffuse:

Les stérols d'origines diverses employés, avaient été irradiés une demi-heure en couche mince de cristaux, puis dissout dans l'huile de lin étudiée, dans la proportion de 1 pour 100. On ajoutait à chaque cristalliseur, avec le même compte-gouttes, XX gouttes de cette solution.

L'essai comportait :

- 1) Huile de lin témoin
- 2) Huile de lin + ergostérol.
- 3) Huile de lin + stérol Huile de Foie de Morue.
- 4) Huile de lin + stérol sang de bœuf.
- 5) Huile de lin + stérol calculs biliaires.
- 6) Huile de lin + stérol cerveau de bœuf.
- 7) Huile de lin + stérol hareng.
- 8) Huile de lin + stérol escargot.
- 9) Huile de lin + zymostérol.

Prises de poids en milligrammes mesurées tous les deux jours.

| 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    |
|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 2,0  | 4,7  | 3,0  | 1,9  | 0,9  | 0,9  | 1,9  | 2,9  |
| 1,6  | 4,2  | 4,9  | 3,1  | 0,5  | 1,5  | 0,9  | 4,6  |
| 2,3  | 7,1  | 4,6  | 3,9  | 2,0  | 2,1  | 1,8  | 2,4  |
| 2,1  | 8,4  | 2,3  | 2,5  | 1,0  | 1,4  | 2,4  | 3,5  |
| 4,9  | 6,4  | 4,4  | 3,0  | 1,2  | 2,2  | 4,7  | 4,7  |
| 1,7  | 8,6  | 5,1  | 4,6  | 3,2  | 1,9  | 1,2  | 3,7  |
| 2,9  | 8,1  | 4,8  | 3,1  | 1,1  | 3,7  | 3,9  | 4,7  |
| 6,2  | 10,5 | 3,3  | 3,6  | 4,7  | 3,6  | 3,8  | 4,8  |
| 6,1  | 6,3  | 3,8  | 6,5  | 2,8  | 6,8  | 6,7  | 4,8  |
| 5,2  | 22,0 | 8,8  | 4,3  | 4,6  | 7,1  | 6,1  | 8,9  |
| 9,1  | 24,1 | 10,8 | 10,5 | 8,6  | 17,0 | 7,2  | 14,5 |
| 9,2  | 42,9 | 14,0 | 11,1 | 8,4  | 4,3  | 8,0  | 21,3 |
| 10,8 | 38,7 | 20,6 | 25,2 | 15,4 | 13,9 | 9,8  | 36,4 |
| 11,3 |      | 33,7 | 20,2 | 9,9  | 17,7 | 12,1 | 27,1 |

Au bout de trente jours, les gains en valeur absolue et en milligrammes ont été, pour chaque échantillon, dans l'ordre des valeurs décroissantes :

2=192 mg 0

8=144 mg 3

3=124 mg 1

4=103 mg 0

6= 84 mg 1

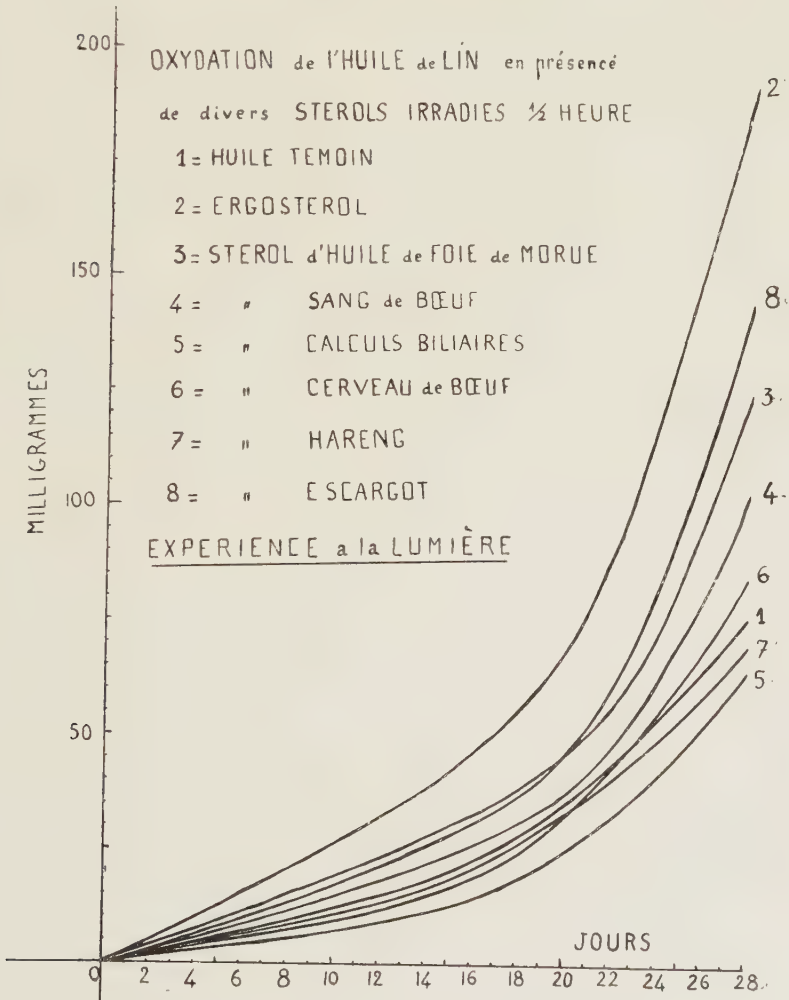
1 = 75 mg 4

9 = 72 mg 8

7 = 70 mg 5

5 = 64 mg 3

Les chiffres des pesées et la courbe qui les résume  
rendent compte de l'allure générale du phénomène.



C'est l'ergostérol qui s'est montré le plus actif, et si nous représentons par l'unité, l'intensité d'oxydation du témoin (1), nous constatons que pour (2), l'oxydation a été intensifiée pour le même temps, dans le rapport de 2,54 à 1.

pour 8, le rapport est de . . . 1,91 pour 1  
pour 3, le rapport est de . . . 1,65 pour 1  
pour 4, le rapport est de . . . 1,37 pour 1  
pour 6, le rapport est de . . . 1,12 pour 1

Quant à 7 et 5, ils ont ralenti l'oxydation dans le rapport:

pour 9, de . . . . . 1,03 à . . . 1  
pour 7, de . . . . . 1,07 à . . . 1  
pour 5, de . . . . . 1,17 à . . . 1

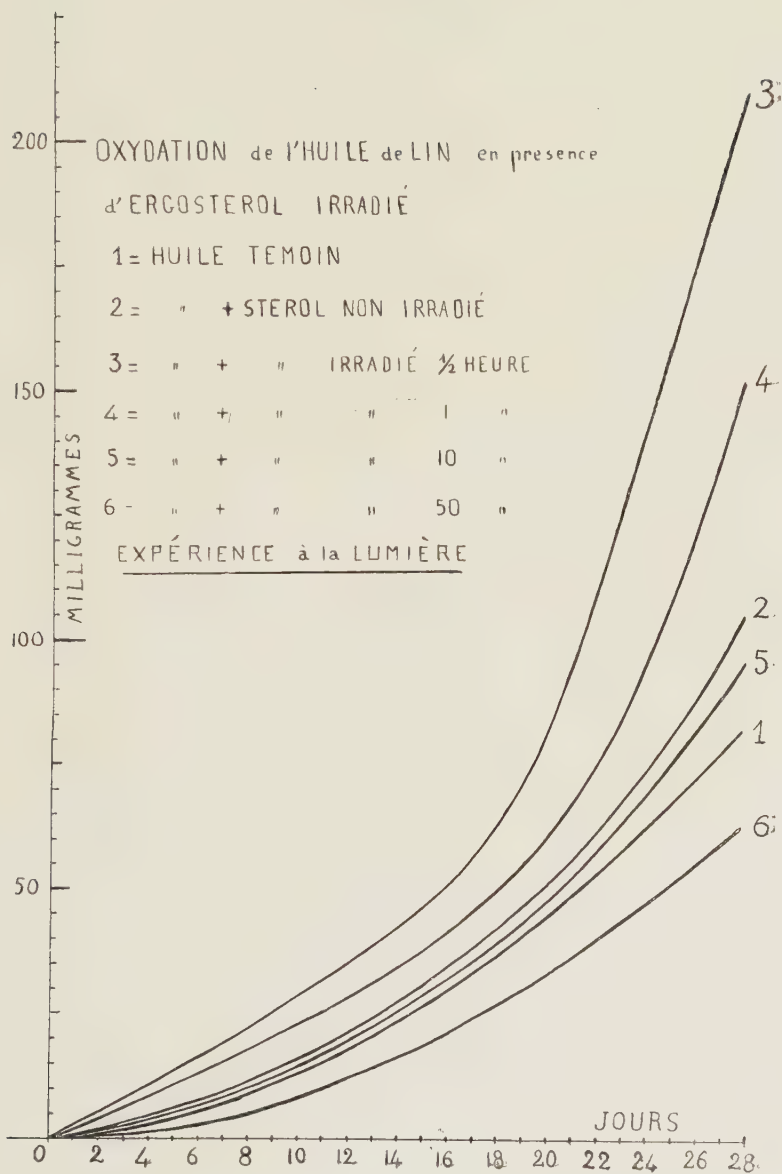
Nous avons étudié les conditions optima de cette accélération, en prenant pour type l'ergostérol et en faisant varier le temps de son irradiation.

L'essai comportait:

- 1) Huile de lin témoin
- 2) Huile de lin + ergostérol non irradié.
- 3) Huile de lin + ergostérol irradié une demi-heure.
- 4) Huile de lin + ergostérol irradié une heure.
- 5) Huile de lin + ergostérol irradié dix heures.
- 6) Huile de lin + ergostérol irradié cinquante heures.

Prises de poids en milligrammes mesurées tous les deux jours

| 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1,1 | 2,6 | 5,2 | 3,4 | 1,1 | 0,5 |
| 1,4 | 1,5 | 5,4 | 5,0 | 2,1 | 0,6 |
| 2,9 | 3,4 | 5,0 | 4,1 | 3,9 | 1,4 |
| 2,7 | 4,6 | 6,9 | 3,9 | 3,9 | 1,3 |



|      |      |      |      |      |     |
|------|------|------|------|------|-----|
| 6,3  | 4,3  | 7,6  | 7,8  | 4,6  | 5,3 |
| 3,1  | 7,0  | 4,3  | 4,3  | 7,1  | 1,9 |
| 4,2  | 4,8  | 4,8  | 4,7  | 4,5  | 3,8 |
| 6,2  | 5,1  | 16,2 | 5,8  | 4,1  | 7,5 |
| 7,2  | 9,2  | 8,3  | 10,4 | 7,1  | 4,9 |
| 12,2 | 10,6 | 17,5 | 15,0 | 10,7 | 4,3 |
| 9,9  | 7,9  | 26,1 | 8,3  | 9,9  | 6,9 |
| 5,8  | 11,5 | 33,2 | 21,6 | 8,1  | 9,5 |
| 7,1  | 14,9 | 35,1 | 24,8 | 13,7 | 6,6 |
| 12,1 | 16,9 | 36,4 | 33,2 | 15,3 | 8,9 |

Les gains en milligrammes et en valeur absolue ont été le trentième jour, dans l'ordre des valeurs décroissantes.

3=212 mg 0

4=152 mg 3

2=104 mg 3

5= 96 mg 1

1= 82 mg 2

6= 63 mg 4

Pour obtenir l'accélération maxima, le temps d'irradiation optimum est donc d'une demi-heure et, dans ces conditions, en prenant pour unité la prise de poids du témoin, l'oxydation a été intensifiée dans le rapport de 2,58 à 1.

Elle est, pour 4, dans le rapport de . . . . 1,85 à . . 1

pour 2, dans le rapport de . . . . 1,26 à . . 1

pour 5, dans le rapport de . . . . 1,17 à . . 1

La durée d'irradiation de dix heures constitue une limite au delà de laquelle l'oxydation au lieu d'être accélérée se trouve ralentie.

Pour une durée de cinquante heures elle est, pour 6, 1,29 fois moindre que pour le témoin.

Ces deux séries d'essais portant sur l'huile de lin, ont été refaits avec des stérols irradiés à l'air libre, mais en filtrant la radiation au moyen d'un verre au nickel, c'est-à-dire à la lumière de Wood. Dans ces conditions, les résultats se sont manifestés dans le même sens ; l'effet d'accélération maximum, au lieu d'être d'une demi-heure, a été de huit à dix heures.

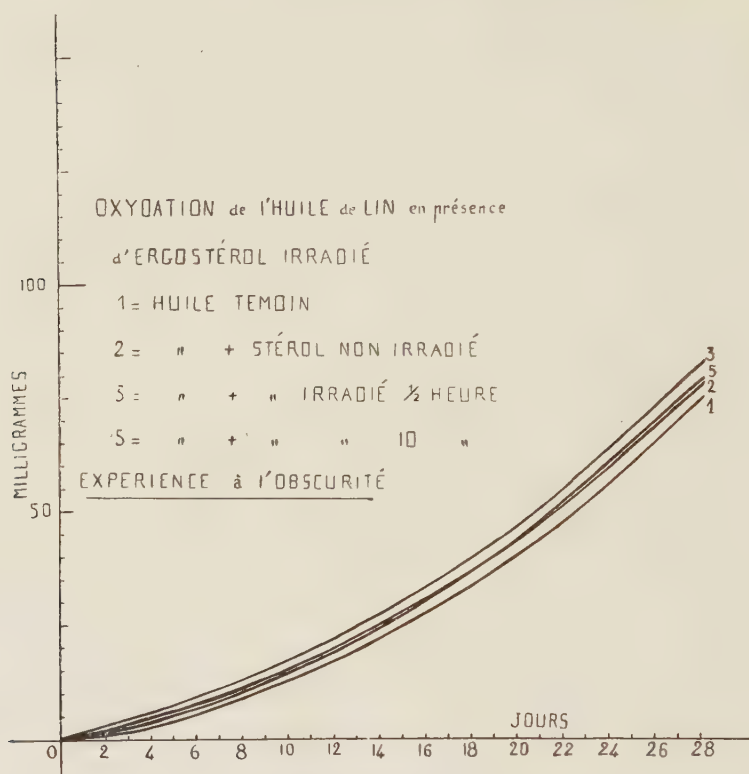
Nous avons alors irradié les stérols à l'abri de l'air, soit en atmosphère d'azote, soit en atmosphère de CO<sup>2</sup>. Les résultats se sont montrés en tous points identiques aux essais faits après l'irradiation à l'air libre.

### Deuxième série d'essais exécutés à l'obscurité:

Prises de poids en milligrammes mesurées tous les deux jours.

| 1    | 2    | 3   | 5    |
|------|------|-----|------|
| 1,7  | 1,5  | 2,6 | 1,5  |
| 1,7  | 3,0  | 3,3 | 2,4  |
| 2,7  | 3,0  | 2,6 | 3,5  |
| 1,7  | 3,9  | 3,1 | 2,1  |
| 3,3  | 3,7  | 7,7 | 5,6  |
| 7,0  | 5,2  | 4,7 | 4,0  |
| 3,7  | 5,8  | 3,0 | 5,9  |
| 6,2  | 5,6  | 6,1 | 3,4  |
| 3,8  | 0,2  | 8,6 | 9,0  |
| 7,2  | 14,1 | 6,7 | 8,3  |
| 12,1 | 5,8  | 5,3 | 6,1  |
| 6,2  | 8,3  | 9,5 | 9,2  |
| 5,0  | 7,4  | 9,9 | 7,5  |
| 12,1 | 10,9 | 9,9 | 10,6 |

Nous avons opéré dans les conditions identiques aux précédentes, mais, dès l'adjonction des stérols, les cristallisoirs contenant l'huile de lin ont été placés dans la cloche à oxygène et mis dans la chambre noire.



Comme en témoigne la courbe, les écarts de poids entre les différents échantillons et les témoins se sont manifestés dans le même sens, mais de façon insignifiante. Ces écarts ne semblent d'ailleurs être dus qu'au temps nécessité par les pesées exécutées à la lumière très atténuée de la salle des balances.

De ces expériences, nous pouvons donc conclure que l'oxydation de l'huile de lin est manifestement accélérée par l'adjonction de stérols irradiés. Cette accélération est optima en présence de l'ergostérol irradié une demi-heure. La lumière est indispensable à ce phénomène.

## II. OXYDATION DE L'HUILE DE FOIE DE MORUE EN PRÉSENCE DES STÉROLS.

Comme pour l'huile de lin, nous avons opéré en deux séries :

Première série d'essais effectués à la lumière diffuse :

Ici encore, les stérols divers employés avaient été irradiés en mince couche de cristaux, une demi-heure à l'air libre avec tout le spectre de l'ultra-violet et dissouts dans la même huile de foie de morue que celle étudiée, dans la proportion de 1 pour 100 ; on ajoutait avec le même compte-gouttes, XX gouttes de cette solution dans chaque cristalliseur.

Le premier essai comportait comme pour l'huile de lin :

- 1) Huile de foie de morue témoin.
- 2) Huile de foie de morue + ergostérol.
- 3) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue.
- 4) Huile de foie de morue + stérol de sang de bœuf.
- 5) Huile de foie de morue + stérol de calculs biliaires.
- 6) Huile de foie de morue + stérol de cerveau de bœuf.
- 7) Huile de foie de morue + stérol de harengs.
- 8) Huile de foie de morue + stérol d'escargot.
- 9) Huile de foie de morue + zymostérol.

Prises de poids en milligrammes mesurées tous les deux jours

| 1    | 2    | 3    | 4    | 5   | 6    | 7    | 8    |
|------|------|------|------|-----|------|------|------|
| 0,9  | 2,4  | 5,2  | 3,9  | 0,6 | 1,7  | 2,8  | 3,0  |
| 1,6  | 2,9  | 5,6  | 4,4  | 1,4 | 2,4  | 3,3  | 3,2  |
| 2,6  | 2,8  | 7,9  | 3,6  | 1,6 | 1,9  | 3,7  | 4,9  |
| 3,1  | 3,2  | 6,8  | 4,2  | 0,9 | 2,8  | 4,1  | 4,8  |
| 1,5  | 6,6  | 9,6  | 7,5  | 3,0 | 4,2  | 5,9  | 7,7  |
| 4,2  | 5,2  | 16,2 | 6,2  | 1,9 | 6,6  | 4,5  | 9,6  |
| 1,1  | 4,4  | 14,0 | 7,4  | 0,4 | 1,2  | 5,6  | 9,9  |
| 3,9  | 5,9  | 24,8 | 14,4 | 2,5 | 6,1  | 7,7  | 13,7 |
| 6,2  | 8,9  | 40,4 | 10,1 | 3,2 | 5,0  | 9,9  | 15,3 |
| 9,9  | 13,5 | 42,9 | 18,9 | 6,2 | 8,2  | 7,8  | 22,2 |
| 9,3  | 16,5 | 39,4 | 37,0 | 4,8 | 6,1  | 8,0  | 23,3 |
| 10,7 | 27,6 | 43,3 | 50,6 | 5,8 | 6,3  | 19,3 | 19,5 |
| 26,2 | 37,7 | 48,8 | 40,7 | 6,0 | 7,1  | 16,9 | 27,0 |
| 35,4 | 49,5 | 44,6 | 44,3 | 9,0 | 10,6 | 20,7 | 30,2 |

Au bout de trente jours, et en valeur absolue, les gains ont été en milligrammes et dans l'ordre des valeurs décroissantes :

3=349 mg 5

4=253 mg 2

8=194 mg 3

2=187 mg 1

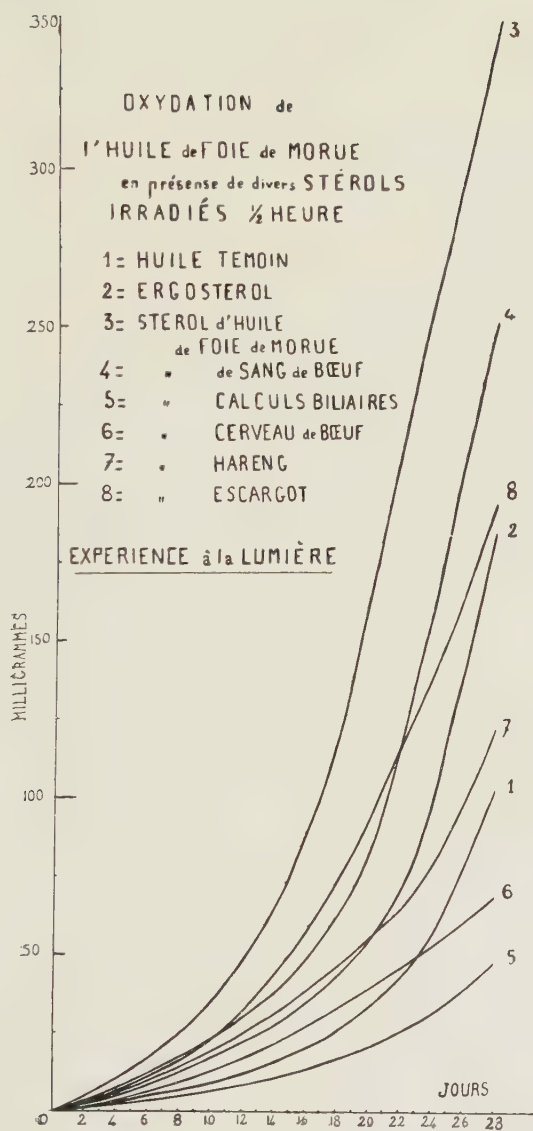
1=150 mg 8

7=120 mg 2

9=112 mg 6

6= 70 mg 2

5= 47 mg 3



C'est donc le stérol extrait de l'huile de foie de morue qui s'est montré le plus actif. En prenant pour unité d'intensité l'oxydation du témoin on est dans le rapport de 2,32 pour 1.

Puis viennent dans l'ordre :

|                                     |             |
|-------------------------------------|-------------|
| Le sang de bœuf dans le rapport . . | 1,67 pour 1 |
| L'escargot . . . . .                | 1,28 pour 1 |
| L'ergostérol . . . . .              | 1,24 pour 1 |

Quant aux autres stérols employés, ils ont ralenti l'oxydation dans l'ordre suivant :

|                                  |             |
|----------------------------------|-------------|
| Hareng dans le rapport . . . . . | 1,25 pour 1 |
| Zymostérol . . . . .             | 1,33 pour 1 |
| Cerveau de bœuf . . . . .        | 2,14 pour 1 |
| Calculs biliaires . . . . .      | 3,18 pour 1 |

Il semble donc ressortir de ces expériences qu'il existe une spécificité marquée dans l'action activante des stérols vis-à-vis de l'oxydation des huiles.

En effet, c'est le stérol extrait de l'huile de foie de morue qui a manifesté à l'endroit de cette huile l'action maxima.

Le rapport pour cette huile est de 2,32 pour 1. Pour l'huile de lin, au contraire, il n'est pour ce même stérol d'huile de foie de morue que de 1,65 pour 1.

Au contraire, si nous considérons un phytostérol comme l'ergostérol, dans son action activante vis-à-vis de ces deux huiles, nous trouvons pour l'action de ce stérol sur l'oxydation de l'huile de foie de morue le rapport 1,24 pour 1, tandis qu'il est pour l'huile de lin de 2,54 pour 1.

Il semble donc y avoir une spécificité d'origine et de règne, les stérols animaux ou zoostérols accélérant après irradiation, électivement les huiles d'origine animale, tandis que les phytostérols sont des accélérateurs dont l'effet est plus marqué sur les huiles végétales.

C'est ainsi que l'oxydation de l'huile de foie de morue a été plus accélérée par le stérol de sang de bœuf et d'escargot que par l'ergostérol.

Ces mêmes stérols de sang de bœuf et d'escargot ont accéléré beaucoup moins l'huile de lin que l'huile de foie de morue. Il est curieux de constater l'effet retardant du stérol de cerveau et du stérol de hareng que l'on aurait pu croire si proche de celui extrait de l'huile de foie de morue.

Nous avons étudié pour l'huile de foie de morue les conditions optima de son oxydation en présence du stérol qui l'accélère au maximum, c'est-à-dire du cholestérol extrait de cette huile même. Nous avons donc, comme dans l'étude comparable de l'ergostérol à l'endroit de l'huile de lin, fait varier le temps et les conditions d'irradiation.

L'essai comportait :

- 1) Huile de foie de morue témoin.
- 2) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue non irradié.
- 3) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue irradié une demi-heure.
- 4) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue irradié une heure.

5) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue irradié dix heures.

6) Huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue irradié cinquante heures.

Prises de poids en milligrammes mesurées tous les deux jours

| 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |
|------|------|------|------|------|------|
| 0,5  | 1,9  | 4,3  | 5,6  | 1,1  | 0,5  |
| 1,6  | 3,0  | 5,2  | 6,3  | 2,0  | 0,6  |
| 1,1  | 2,7  | 4,7  | 3,9  | 1,9  | 0,8  |
| 1,6  | 4,2  | 7,1  | 6,7  | 3,5  | 0,7  |
| 2,1  | 3,1  | 5,8  | 7,8  | 2,7  | 0,9  |
| 2,2  | 6,2  | 6,0  | 8,2  | 3,9  | 2,2  |
| 4,1  | 5,5  | 13,4 | 3,8  | 2,2  | 0,8  |
| 3,5  | 5,7  | 17,0 | 15,7 | 7,8  | 1,0  |
| 3,9  | 6,0  | 22,4 | 12,9 | 5,8  | 1,1  |
| 3,9  | 10,6 | 25,5 | 7,5  | 7,4  | 4,1  |
| 10,6 | 7,2  | 41,9 | 26,0 | 5,8  | 11,1 |
| 9,4  | 16,9 | 41,5 | 21,2 | 9,8  | 5,9  |
| 15,6 | 13,9 | 50,1 | 42,2 | 12,3 | 10,2 |
| 25,8 | 49,0 | 44,5 | 35,6 | 11,2 |      |

Les gains, le trentième jour, en valeur absolue, ont été dans l'ordre des valeurs décroissantes:

3=290 mg 4

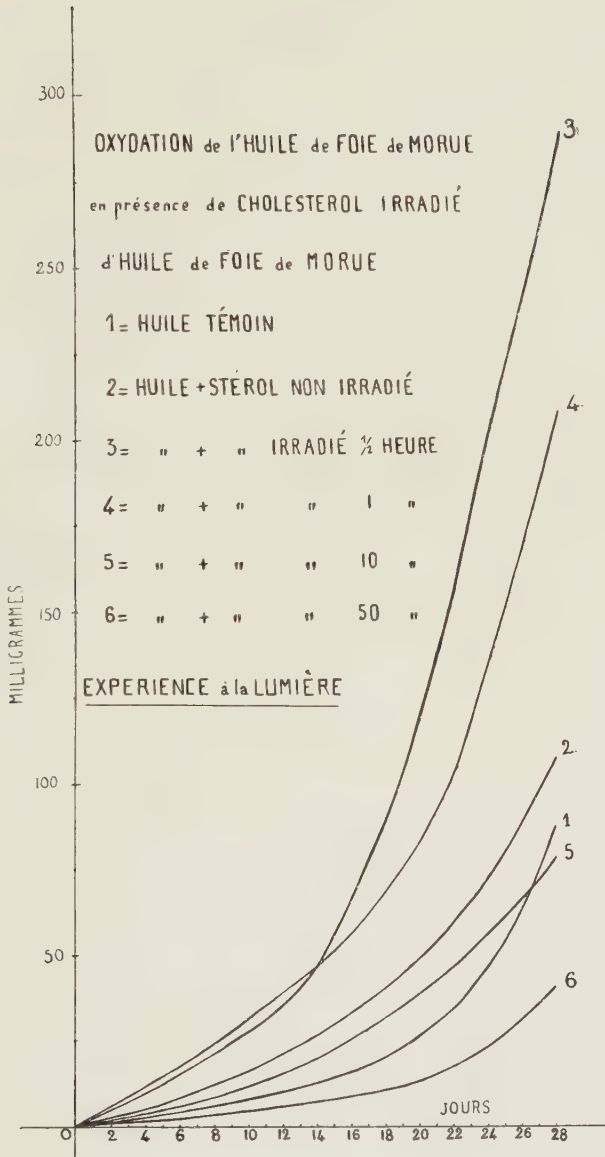
4=203 mg 4

2=106 mg 9

1= 85 mg 9

5= 77 mg 4

6= 39 mg 9

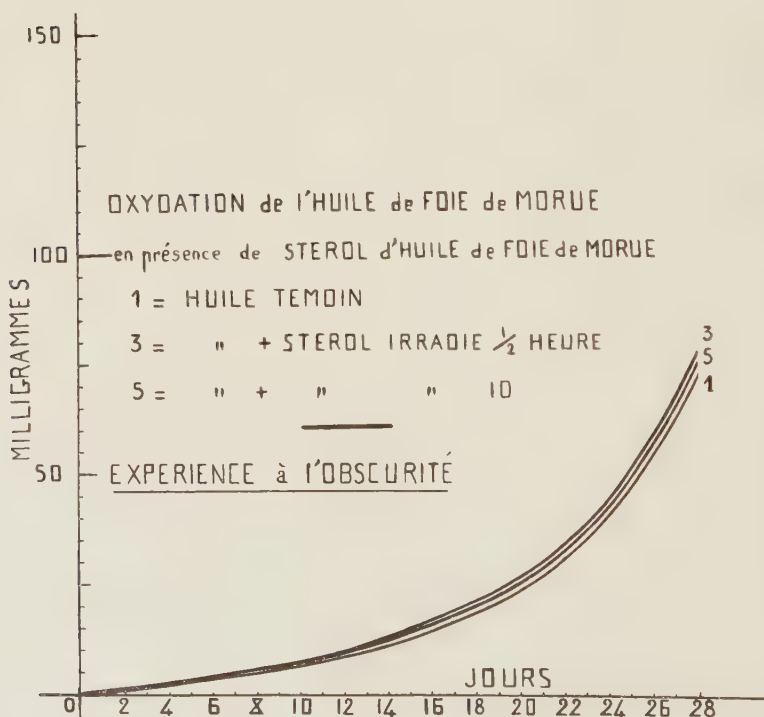


Ici encore, c'est l'irradiation d'une demi-heure qui s'est montrée la plus activante et en prenant pour unité d'intensité d'oxydation celle du témoin, nous constatons le rapport de 3,38 à 1.

De même, le temps de dix heures constitue une limite à l'accélération, au-delà de laquelle l'oxydation est ralentie. Pour cinquante heures, elle est 2,15 fois moins rapide que pour le témoin.

Ces résultats concordent donc en tous points avec ceux obtenus sur l'huile de lin.

Ils concordent encore si on irradie les stérols en lumière de Wood, ou si l'irradiation est effectuée en atmosphère d'azote ou de  $\text{CO}_2$ .



Deuxième série d'essais effectués à l'obscurité.

De même que pour l'huile de lin, l'action activante des stérols irradiés sur l'huile de foie de morue s'est montrée nulle à l'obscurité. Les faibles écarts dont témoignent les chiffres des pesées et que traduisent les courbes, ne sont dus qu'au temps employé pour effectuer les pesées à la lumière diffuse de la salle des balances.

Toutes ces expériences ont été refaites tant à la lumière qu'à l'obscurité, en ajoutant au mélange huile+stérol une trace d'un antioxydant, en l'espèce, l'essence de térébenthine ou l'hydroquinone. Dans tous les cas, l'oxydation de l'huile s'est trouvée tellement ralentie, qu'au bout d'un mois les différences en poids se sont révélées insignifiantes et de l'ordre de 25 à 50 milligrammes pour des échantillons de 20 grammes.

De plus, quel que soit le stérol employé, ou pour un même stérol, son temps d'irradiation, en aucun cas nous n'avons constaté une oxydabilité plus marquée pour les échantillons stérolés. Bien au contraire, ce sont les témoins qui ont manifesté en prise de poids, une très légère différence en plus, de l'ordre de 2 à 5 milligrammes, comme si en présence d'un anti-oxydant, l'adjonction de stérol irradié gênait l'oxydation de l'huile.

De ces essais, nous pouvons tirer les conclusions suivantes:

C'est l'irradiation des stérols en couche mince de cristaux, d'une durée de trente minutes, à l'air libre,

qui répond aux conditions optima d'accélération de l'oxydabilité des huiles étudiées. En filtrant la radiation, on ralentit cette action, mais en irradiant en atmosphère d'azote, ou de gaz carbonique à l'aide de tout le spectre de l'ultra-violet, on ne modifie en rien les résultats précédents, ce qui démontre que cette action activante est bien un phénomène créé par l'irradiation, mais secondaire à elle, l'oxygène, indispensable à cette action, s'il n'est pas présent au moment de l'irradiation, se rencontrant partout au cours des manipulations successives.

Par contre, si l'on étudie l'oxydation des huiles dans les mêmes conditions, mais à l'obscurité, on n'observe plus aucune différence. La lumière est donc comme l'oxygène un facteur indispensable à cette action.

Nous retrouvons ici les deux mêmes facteurs que dans l'action photo-active observée au chapitre précédent. Et nous retrouvons au moins un de ces facteurs, la lumière, dans l'action antirachitique de ces mêmes stérols. Les auteurs n'attribuent pas cette action thérapeutique à l'action de l'oxygène. Nous nous garderons bien de prendre position dans le débat. Seule la connaissance précise des modifications apportées par l'irradiation à l'édifice moléculaire des stérols, pourra permettre d'élucider la question. Mais les faits que nous avons observés, tant au sujet de l'action photo-active, que de l'autoxydation des huiles, militent en faveur de la synergie fonctionnelle de deux facteurs, indispensables dans les actions exercées par les stérols irradiés :

1<sup>o</sup> La lumière sous forme d'irradiation ultraviolette ou d'insolation plus ou moins diffuse.

2<sup>o</sup> L'oxygène.

Le premier de ces facteurs ne serait-il pas le précurseur de l'autre, une manière de mise en tension de la molécule, au niveau de ses liaisons éthyléniques, se manifestant par une labilité plus grande et une aptitude réactionnelle plus marquée, et qui préparerait le stérol à une action secondaire d'oxydabilité catalytique.

Il serait alors vraiment curieux, que dans la seule action thérapeutique sur le rachitisme, on constate la carence de ce facteur oxygène.

#### CINÉTIQUE DES RÉACTIONS.

Pour interpréter les réactions représentées par des séries de chiffres dont l'accroissement mesure la vitesse, la chimie physique propose l'emploi de diverses constantes que nous allons appliquer aux réactions étudiées.

Les séries de chiffres obtenus sont les quantités de produits formées en fonction des temps. Toutes les réactions étudiées sont traduites en courbes dont les abscisses représentent les temps et les ordonnées les quantités des corps obtenus.

Le premier examen des courbes constitue une étape qui donne très souvent d'utiles renseignements.

L'interprétation des courbes peut être faite suivant deux méthodes différentes.

La première, part d'une hypothèse vers le mode de combinaison des molécules, et, par un raisonnement mathématique, elle déduit l'équation qui doit s'adapter à l'expérience, si cette dernière se réalise suivant l'hypothèse formulée.

Toutes les formules proposées comprennent un facteur de proportionnalité entre variables et la quantité fournie par l'expérience.

L'équation appliquée à l'expérience nous fournit alors un facteur de proportionnalité invariable, qui n'est qu'une constante de vitesse de réaction. Nous avons appliqué les constantes suivantes:

1. Constante de premier ordre:

$$K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$$

où:  $a$  = la quantité de matière finale

$x$  = la quantité de substance d'un corps, transformée à un instant  $t$ .

Cette constante part d'une hypothèse de réaction monomoléculaire.

Prenons au hasard quelques réactions:

|                                                                                                                 | <u>t</u> | <u>x</u> | <u>k</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| Courbe huile de foie de morue + stérol de calculs biliaires, irradié de mi-heure.<br><br>$a = 47 \text{ mg } 3$ | 2        | 0,6      | 0,0051   |
|                                                                                                                 | 6        | 3,6      | 0,0129   |
|                                                                                                                 | 10       | 7,5      | 0,0166   |
|                                                                                                                 | 14       | 9,8      | 0,0166   |
|                                                                                                                 | 18       | 15,5     | 0,0219   |
|                                                                                                                 | 22       | 26,5     | 0,0164   |
|                                                                                                                 | 26       | 38,3     | 0,0604   |

|                                                                                                                     | t  | x    | K      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|--------|
|                                                                                                                     | —  | —    | —      |
| Courbe Huile de foie de morue<br>+ stérol d'huile de foie de morue ir-<br>radié cinquante heures.<br><br>a=39 mg. 9 | 2  | 0,5  | 0,0051 |
|                                                                                                                     | 6  | 1,9  | 0,0081 |
|                                                                                                                     | 10 | 2,6  | 0,0058 |
|                                                                                                                     | 14 | 6,5  | 0,0124 |
|                                                                                                                     | 18 | 8,6  | 0,0134 |
|                                                                                                                     | 22 | 23,8 | 0,0378 |
|                                                                                                                     | 26 | 29,7 | 0,0488 |

|                                                                                             | t  | x    | K      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|------|--------|
|                                                                                             | —  | —    | —      |
| Courbe Huile de lin + stérol calculs<br>biliaires irradié une demi-heure.<br><br>a=64 mg. 3 | 2  | 0,9  | 0,0053 |
|                                                                                             | 6  | 3,4  | 0,0083 |
|                                                                                             | 10 | 5,6  | 0,0088 |
|                                                                                             | 14 | 9,9  | 0,0115 |
|                                                                                             | 18 | 17,4 | 0,0116 |
|                                                                                             | 22 | 30,6 | 0,0292 |
|                                                                                             | 26 | 54,4 | 0,0714 |

|                                                                                   | t  | x    | K      |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|------|--------|
|                                                                                   | —  | —    | —      |
| Courbe Huile de lin + ergostérol ir-<br>radié cinquante heures.<br><br>a=63 mg. 4 | 2  | 0,5  | 0,0051 |
|                                                                                   | 6  | 2,5  | 0,0066 |
|                                                                                   | 10 | 9,1  | 0,019  |
|                                                                                   | 14 | 14,5 | 0,018  |
|                                                                                   | 18 | 27,2 | 0,031  |
|                                                                                   | 22 | 38,4 | 0,042  |
|                                                                                   | 26 | 54,5 | 0,075  |

|                                                      | t  | x    | K      |
|------------------------------------------------------|----|------|--------|
|                                                      | —  | —    | —      |
| Courbe Huile de lin à l'obscurité.<br><br>a=74 mg. 4 | 2  | 1,7  | 0,010  |
|                                                      | 6  | 6,1  | 0,0147 |
|                                                      | 10 | 11,1 | 0,0158 |
|                                                      | 14 | 21,8 | 0,0244 |
|                                                      | 18 | 31,8 | 0,0311 |
|                                                      | 22 | 51,1 | 0,0525 |
|                                                      | 26 | 62,3 | 0,0759 |

Cette constante de premier ordre ne semble pas s'appliquer à nos expériences.

2. La constante de deuxième ordre:

$$K = \frac{1}{t} \frac{x}{a(a-x)}$$

part d'une hypothèse bimoléculaire.

Calculons là pour les mêmes réactions:

|            | t  | x    | K        |
|------------|----|------|----------|
|            | —  | —    | —        |
| a=47 mg. 3 | 2  | 0,6  | 0,000136 |
|            | 6  | 3,6  | 0,00029  |
|            | 10 | 7,5  | 0,0004   |
|            | 14 | 9,8  | 0,0004   |
|            | 18 | 15,5 | 0,0006   |
|            | 22 | 26,5 | 0,0012   |
|            | 26 | 38,3 | 0,0035   |

|            | t  | c    | K       |
|------------|----|------|---------|
|            | —  | —    | —       |
| a=39 mg. 9 | 2  | 0,5  | 0,00016 |
|            | 6  | 1,9  | 0,00022 |
|            | 10 | 2,6  | 0,00018 |
|            | 14 | 6,5  | 0,00036 |
|            | 18 | 8,6  | 0,00038 |
|            | 22 | 23,8 | 0,0015  |
|            | 26 | 29,7 | 0,0051  |

|            | t  | x    | K       |
|------------|----|------|---------|
|            | —  | —    | —       |
| a=64 mg. 3 | 2  | 0,9  | 0,00011 |
|            | 6  | 3,4  | 0,00014 |
|            | 10 | 5,6  | 0,00015 |
|            | 14 | 9,9  | 0,00022 |
|            | 18 | 17,4 | 0,00031 |
|            | 22 | 30,6 | 0,00064 |
|            | 26 | 54,4 | 0,0032  |

|            | t  | x    | K       |
|------------|----|------|---------|
|            | —  | —    | —       |
| a=63 mg. 4 | 2  | 0,5  | 0,00006 |
|            | 6  | 2,5  | 0,00011 |
|            | 10 | 9,1  | 0,00026 |
|            | 14 | 14,5 | 0,00033 |
|            | 18 | 27,2 | 0,00066 |
|            | 22 | 38,4 | 0,0011  |
|            | 26 | 54,5 | 0,0037  |
|            | t  | x    | K       |
|            | —  | —    | —       |
| a=74 mg. 4 | 2  | 1,7  | 0,00016 |
|            | 6  | 6,1  | 0,0002  |
|            | 10 | 11,1 | 0,00023 |
|            | 14 | 21,8 | 0,00039 |
|            | 18 | 31,8 | 0,00056 |
|            | 22 | 51,1 | 0,0013  |
|            | 26 | 62,3 | 0,0098  |

Comme on le voit, cette constante ne s'applique pas non plus.

3. Enfin si l'on suppose, grâce à la présence de l'oxygène et de corps volatils formés au cours de la combustion, que le milieu étudié est hétérogène, on peut employer la constante donnée par l'équation de Bodenstein :

$$K = \frac{1}{t} \ln \left( \frac{1 + V_x^-}{1 - V_x^-} - 2 V_x^- \right)$$

Le calcul de cette constante a été fait encore pour les mêmes réactions :

|            | t  | x    | K        |
|------------|----|------|----------|
|            | —  | —    | —        |
| a=47 mg. 3 | 2  | 0,6  | 0,000062 |
|            | 6  | 3,6  | 0,000127 |
|            | 10 | 7,5  | 0,00106  |
|            | 14 | 9,8  | 0,00143  |
|            | 18 | 15,5 | 0,00167  |
|            | 22 | 26,5 | 0,00267  |
|            | 26 | 38,3 | 0,00332  |

|            | t  | x    | K        |
|------------|----|------|----------|
|            | —  | —    | —        |
| a=39 mg. 9 | 2  | 0,5  | 0,000051 |
|            | 6  | 1,9  | 0,000065 |
|            | 10 | 2,6  | 0,00011  |
|            | 14 | 6,5  | 0,00074  |
|            | 18 | 8,6  | 0,00061  |
|            | 22 | 23,8 | 0,0021   |
|            | 26 | 29,7 | 0,0026   |

|            | t  | x    | K        |
|------------|----|------|----------|
|            | —  | —    | —        |
| a=64 mg. 3 | 2  | 0,9  | 0,000092 |
|            | 6  | 3,4  | 0,00012  |
|            | 10 | 5,6  | 0,00102  |
|            | 14 | 9,9  | 0,00142  |
|            | 18 | 17,4 | 0,00218  |
|            | 22 | 30,6 | 0,00393  |
|            | 26 | 54,4 | 0,00505  |

|            | t  | x    | K        |
|------------|----|------|----------|
|            | —  | —    | —        |
| a=63 mg. 4 | 2  | 0,5  | 0,000051 |
|            | 6  | 2,5  | 0,000087 |
|            | 10 | 9,1  | 0,00109  |
|            | 14 | 14,5 | 0,00213  |
|            | 18 | 27,2 | 0,00273  |
|            | 22 | 38,4 | 0,00394  |
|            | 26 | 54,5 | 0,05048  |

|            | t  | x    | K       |
|------------|----|------|---------|
|            | —  | —    | —       |
| a=74 mg. 4 | 2  | 1,7  | 0,00018 |
|            | 6  | 6,1  | 0,00168 |
|            | 10 | 11,1 | 0,00203 |
|            | 14 | 21,8 | 0,00349 |
|            | 18 | 31,8 | 0,00385 |
|            | 22 | 51,1 | 0,00556 |
|            | 26 | 62,3 | 0,00574 |

Nous sommes obligés de constater que cette constante ne s'applique pas non plus.

Force nous est donc de revenir à la deuxième méthode purement mathématique qui consiste à trouver une formule qui s'adaptera mieux aux résultats trouvés.

Le calcul de quelques courbes représentant les réactions nous donne les résultats suivants:

$$\left. \begin{array}{l} \text{Huile de foie de morue té} \\ \text{moïn.} \end{array} \right\} t=13x-0,23 x^2+0,035 x^3$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{Huile de foie de morue} \\ \text{+ stérol calculs biliaires} \\ \text{Irradié demi-heure} \end{array} \right\} t=1,31 x+1,27 x^2+0,02 x^3$$

$$\left. \begin{array}{l} \text{Huile de foie de morue} \\ \text{+ stérol cerveau de bœuf} \\ \text{Irradié demi-heure} \end{array} \right\} t=4,8169 x-5,1553 x^2+2,1984x^3$$

où t représente les temps de réaction et x les quantités obtenues.

L'examen de ces courbes et de leurs équations ainsi que les autres courbes nous montre que nous avons affaire aux paraboles de n<sup>eme</sup> ordre du type.

$$Y=a_1x+a_2x^2+a_3x^3+\dots$$

auxquelles il s'agit de trouver une interprétation physique.

La réalisation de la réaction se produit suivant une loi de parabole tout au moins pendant le premier mois.

Toutes les expériences qui précèdent ont été faites à la pression atmosphérique. Dans ces conditions, le phénomène se passe dans tous les cas de la même manière pour une même huile. Si nous considérons par exemple l'huile de foie de morue, dans les trois premiers jours, c'est la perte de poids qui l'emporte. Cette perte est sensiblement la même pour tous les échantillons. Nos courbes ne traduisent donc que les gains de poids, c'est-à-dire qu'elles ne représentent le phénomène qu'à partir du quatrième jour. Mais, si au lieu de placer les cristallisoirs d'emblée dans la cloche à oxygène, à la pression ordinaire, nous les soumettons pendant quelques jours au vide, les choses ne se passent plus du tout de la même manière.

Nous avons pris deux lots identiques de chacun trois cristallisoirs contenant 20 grammes d'huile de foie de morue.

Le premier lot que nous appellerons A B C comportait :

A huile de foie de morue témoin

B huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue insolé.

C huile de foie de morue + stérol d'huile de foie de morue irradié une demi-heure.

Le deuxième lot étiqueté A' B' C' comportait la même distribution ; mais tandis que le lot A B C était placé directement dans la cloche à oxygène, à la lumière diffuse du laboratoire, le lot A' B' C' était placé dans les mêmes conditions d'éclairage sous une cloche où le vide était fait à 1 centimètre de mercure.

Les pesées faites tous les deux jours ont donné les chiffres suivants :

|   |                              |       |         |
|---|------------------------------|-------|---------|
| A | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 5 mg. 3 |
| B | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 5 mg. 1 |
| C | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 5 mg. 1 |

Deux jours après les pesées révélaient pour ce groupe des prises de poids divergentes comme dans les expériences précédentes et dans le même sens.

Pour le groupe soumis au vide, les pesées ont révélé :

|    |                              |       |          |
|----|------------------------------|-------|----------|
| A' | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 11 mg. 2 |
| B' | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 9 mg. 5  |
| C' | au bout de 48 heures, perte. | . . . | 10 mg. 8 |

Une deuxième pesée effectuée deux jours après donnait :

|    |                            |       |          |
|----|----------------------------|-------|----------|
| A' | au bout de 2 jours, perte. | . . . | 38 mg. 2 |
| B' | au bout de 2 jours, perte. | . . . | 17 mg. 1 |
| C' | au bout de 2 jours, perte. | . . . | 1 mg. 2  |

Ce qui donne au total pour les quatre premiers jours :

|    |        |           |          |
|----|--------|-----------|----------|
| A' | perte. | . . . . . | 49 mg. 5 |
| B' | perte. | . . . . . | 28 mg. 6 |
| C' | perte. | . . . . . | 12 mg. 0 |

La seule adjonction à l'huile, du stérol extrait de cette huile sans que ce stérol ait subi d'autre activation que la lumière diffuse dans un flacon, a donc fait diminuer de moitié la perte de poids dans les quatre premiers jours.

Mais si à cette huile on ajoute ce même stérol irradié une demi-heure, cette perte de poids n'apparaît plus que du quart.

Les cristallisoirs ont été maintenus dans le vide pendant dix jours et les pesées au bout de ce temps, ont révélé une augmentation de poids comme suit :

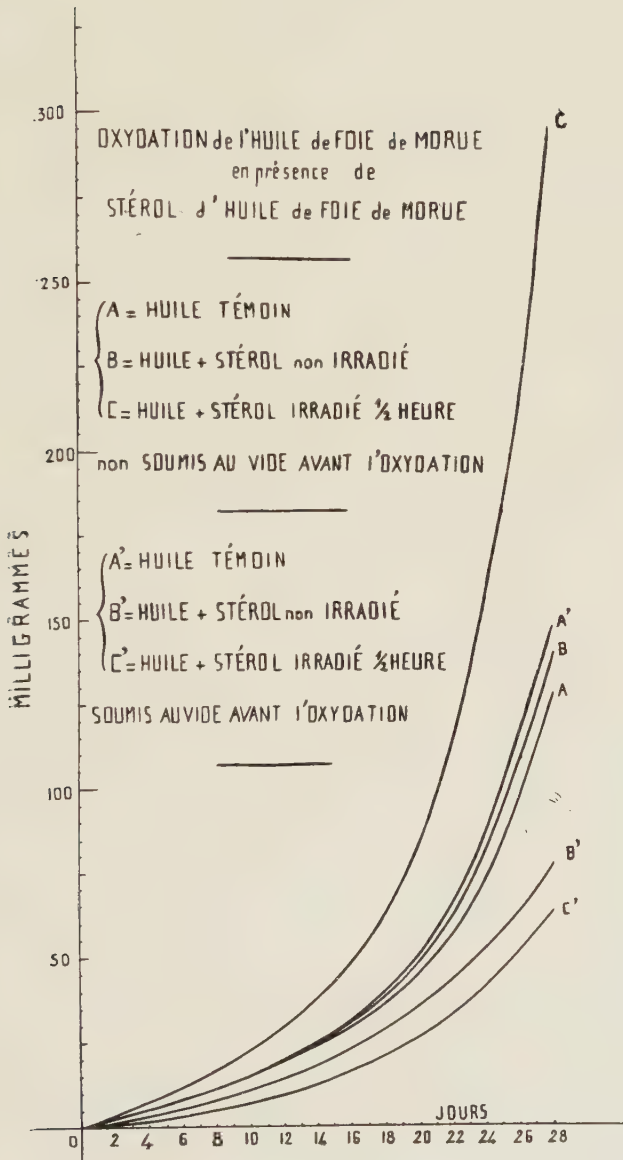
|                  |         |
|------------------|---------|
| A' gain. . . . . | 5 mg. 5 |
| B' gain. . . . . | 5 mg. 6 |
| C' gain. . . . . | 6 mg. 1 |

Le vide n'étant pas absolu dans la cloche et les pesées s'effectuant à l'air libre, ces deux conditions ont été suffisantes pour permettre à l'huile de s'oxyder. A partir de ce moment, le phénomène semblant marcher parallèlement dans les deux groupes, les cristallisoirs A' B' C' ont été placés dans la cloche à oxygène à côté de A B C, et les pesées ont été effectuées tous les deux jours pour les deux groupes.

Les courbes ne représentent donc que les prises de poids pendant un temps égal, soit trente jours. A' B' C' étant en retard de quinze jours sur A B C.

Or, nous constatons que pour le groupe A B C le phénomène est identique à ce que nous avons observé précédemment.

Mais pour le groupe A' B' C' il est complètement inversé. L'oxydation de A' est bien à peu près égale



à celle de A, quoique un peu supérieure. Pour B' elle est légèrement ralentie si on la compare au témoin et à l'échantillon B. Quant à C' elle est considérablement ralentie en comparaison des témoins et surtout de l'échantillon C. Comment peut-on interpréter ce phénomène ?

D'abord, en considérant les pertes de poids du groupe A' B' C' il semble que les stérols et surtout les stérols irradiés fixent dans l'huile des produits volatils probablement en les oxydant. L'hypothèse d'aldéhydes semble la plus vraisemblable.

Si nous considérons les gains de poids, il apparaît que ces corps volatils oxydés et fixés par les stérols, surtout après irradiation, empêchent ou ralentissent l'oxydation subséquente.

Il semble donc que les stérols pour agir sur l'auto-oxydation des huiles aient besoin de la présence des corps volatils que le vide leur fait perdre. Il y aurait entre ces deux classes de corps un processus réactionnel, dont le résultat serait une plus grande fixation d'oxygène sur les doubles liaisons des acides gras.

Nous avons tenté de déterminer la nature de ces corps volatils. Pour ce faire, nous avons soumis l'huile de foie de morue au vide, dans une cloche à deux tubulures et nous avons pu, en faisant passer lentement le contenu de l'atmosphère de la cloche dans des barboteurs contenant les réactifs, caractériser la présence de produits aldéhydiques par les réactions les plus caractéristiques : Fuchsine bisulfitée, azotate d'argent ammoniacal,

Par ce même moyen, nous avons pu mettre en évidence la présence de produits acides, à l'aide de réactifs indicateurs.

Nous avons essayé de faire un dosage et une combustion de ces produits volatils pour un litre d'huile. Les chiffres que nous avons obtenus en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  sont tellement faibles qu'ils ne compensent pas les erreurs d'expérience.

### CONCLUSIONS

De ces diverses expériences nous pouvons conclure :

1<sup>o</sup> Que les stérols sont pour les huiles siccatives des autoxydateurs.

2<sup>o</sup> Que cette autoxydation est spécifique pour le stérol extrait de l'huile elle-même.

3<sup>o</sup> Que l'irradiation accélère cette action avec un maximum au bout d'une demi-heure et une limite à dix heures d'irradiation.

4<sup>o</sup> Que cette irradiation peut avoir lieu à l'air libre ou en atmosphère d'azote, avec tout le spectre, ou en lumière de Wood, sans modifier l'action activante.

5<sup>o</sup> Que la lumière est indispensable à cette autoxydation.

6<sup>o</sup> Que des produits volatils de nature aldéhydiques contenus dans l'huile de foie de morue favorisent l'autoxydation de cette huile par son stérol irradié.



## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

### I

La notion de cholestérine, déchet cellulaire, ne répond plus aux connaissances actuelles. Les travaux de ces vingt dernières années ont contribué à ranger le cholestérol dans une classe de corps similaires, les stérols avec deux sous-groupes: les zoostérols, et les phytostérols.

L'importance biochimique des premiers semble dépendante des seconds. Le cholestérol animal pourrait bien être exclusivement d'origine exogène et provenir tout entier des phytostérols, par l'alimentation. Les organismes supérieurs se contenteraient de transformer la molécule de phytostérol en cholestérol.

### II

Celui-ci avec une seule liaison éthylénique cyclique ne présente plus la labilité des stérols d'origine végétale et en particulier de l'ergostérol, pour lequel l'indice d'iode a révélé au moins trois doubles liaisons dont une probablement en bout de la chaîne latérale.

Ces corps sont singulièrement activés par les rayons à courte longueur d'onde et à grande fréquence vibratoire.

Il est probable que cette activation ressortit essentiellement à l'ergostérol et se trouve en rapport avec la présence dans sa molécule des liaisons éthyliques.

### III

Nous avons observé l'action des stérols irradiés sur la plaque photographique. Ces corps n'agissent qu'après irradiation. La présence de l'air est nécessaire à cette action. Cette photo-activité disparaît au bout de deux mois. C'est l'ergostérol qui s'est révélé le plus actif.

Nous avons pu mettre en évidence dans cette action la présence d'oxygène peroxydique et d'aldéhydes.

Il y a lieu de penser à la formation d'un peroxyde, probablement d'un ozonide. L'agent photo-actif se comportant à certains points de vue comme un agent physique, on ne peut, à côté des phénomènes chimiques certains, exclure l'hypothèse d'un agent physique.

### IV

Les stérols jouent vis-à-vis des huiles siccatives le rôle d'autoxydateurs spécifiques de l'huile d'où on les a extraits. L'irradiation accélère cette action. Pour l'huile de foie de morue, en particulier, la présence de corps volatils de nature aldéhydique contenus dans cette huile est indispensable à cette autoxydation par son stérol irradié.

## V

Tous ces faits mettent bien en évidence l'activité réactionnelle des stérols dans les phénomènes biochimiques et dans les oxydations en particulier.

Y a-t-il une corrélation entre ces phénomènes et l'action antirachitique des stérols. Bien que les auteurs en général n'admettent pas cette manière de voir, nous sommes tenté de conclure que l'oxydabilité des stérols étant un phénomène d'ordre général, elle doit intervenir dans leur action thérapeutique.

L'irradiation ne serait qu'un temps préparatoire à cette oxydation, mettant la molécule en état de réceptivité plus grande, en préparant les doubles liaisons à une aptitude réactionnelle plus marquée.



## BIBLIOGRAPHIE

L'étude des stérols a été l'objet d'une quantité considérable de mémoires. Nous ne prétendons pas les citer tous. Nous n'avons rapporté ici que ceux consultés par nous ou qui ont un rapport plus direct avec les questions que nous avons traitées.

ADAMS (G.) and MAC COLLUM (E.-V.). — A method for the biological assay of cod liver oil (*Journ. Biol. Chem.*, 1928, LXXVIII, p. 495-524).

ANDERSON (R.-J.). — Properties of cholesterol obtained from different sources (*Journ. Bio. Chem.*, 1926-27, LXXI, 407-418).

ANDERSON (W.-T.) and MACHT (D.-I.). — The penetration of ultraviolet rays into live animal tissue (*Amer. Journ. of Physiol.*, 1928, LXXXVII, p. 320).

ANDERSON (R.-J.) and SHRINER (R.-L.). — The reduction products of certain plant sterols (*Journ. Biol. Chem.*, 1927, LXXI, p. 401).

BECH (O.). — Ueber die angebliche photoactivität bestrahlter Substanzen (*Mon. f. Kind.*, 1926, pp. 33-320).

BEUMER (H.). — Ueber das Rachitisproblem und die Wirkung ultra-violetter Strahlen auf das Cholesterin (*Munch. Med. Woch.*, 1925, LXXII, 1585).

BIANCANI (E. et H.). — Introduction à l'étude du mode d'action biologique des rayons ultra-violets (*Journ. Med. Franç.*, 1925, pp. 14-347).

— Essai d'interprétation sur la similitude d'action des rayons U. V. et l'huile de foie de morue (*Rev. d'actin.*, 1925, I, p. 67).

BILLS (C.-E.) and HONEYWELL (E.-M.). — Antiricketic substances VIII (*Journ. Biol. Chem.*, 1928, LXXX, p. 15).

- BILLS (C.-E.), HONEYWELL and COX (W.-M.). — Antiricketic substances IX (*Journ. Biol. Chem.*, 1928, LXXX, p. 557).
- BILLS (C.-E.), HONEYWELL and MAC NAIR (W.). — Antiricketic substances (*Journ. Biol. Chem.*, 1928, LXXVI, p. 251).
- BILLS (C.-E.) and MAC DONALD (F.-G.). — The polymerization of cholesterol (*Journ. Biol. Chem.*, 1926, LXXVIII, p. 821).
- BLUM (L.), DELAVILLE (M.) et VAN CAULAERT. — Sur la pathogénie du rachitisme (*Presse médicale*, 17 juin 1925).
- CLUZET (J.) et KOFMAN. — Effets photo-chimiques produits par les stérols qui ont été exposés aux radiations de courte longueur d'onde (*Arch. d'électr. méd.*, octobre 1929, n° 550).
- *C. R. Soc. Biol.*, 18 février 1929.
- *C. R. Soc. Biol.*, 1<sup>er</sup> juillet 1929.
- COUTURE (E.). — Oxydation des huiles en présence des stérols irradiés (*C. R.*, 1930, t. 190, p. 532).
- COPPING (A.-M.). — The iodine values of some sterols by Dam's method (*Bioch. Journ.*, 1928, XXII, p. 1142).
- DE CRINIS. — Über die Photoaktivität des Gehirnes (*Klin. Woch.* 1927, pp. 5, 213).
- DAM (H.). — Jodzahlbestimmungen an Cholesterin (*Bioch Zeit.*, 1924, CLII, p. 101).
- DAUBNEY (C. G.) and SMEDLEY MAC LEAN (I.). — Note on the unsaponifiable matter of yeast fat. (*Bioch. Journ.*, 1927, XXI, p. 869).
- DEJUST (L.-H.), VAN STOLK (Mlle) et DUREUIL (M.-E.). — Sur la présence de l'ergostérol dans le sang humain (*C. R.*, 1928, CLXXXVII, p. 311).
- DELORE (P.). — Influence de l'irradiation préalable sur l'oxydation à l'air libre de l'huile de foie de morue (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, IC, p. 805).
- *Bull. Soc. Chim. Biol.*, t. XI, n° I, 1929.
- DIELS und ABDERHALDEN. — *Ber. Chem. Gesell.*, 1904, t. 37, p. 3099.
- DŒUVRE (J.). — Emploi de l'ozone pour la détermination de la constitution des composés non saturés (*Bull. Soc. Chim.*, 10, I, 1929).

- DOGNON (A.). — L'action des rayons X sur la cholestérine in vitro (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, LXLV, p. 1433).
- DORLENCOURT, DEBRAY et SPANIEN. — Contribution à l'étude de l'insaponifiable de l'huile de foie de morue (*C. R. Biol.*, 1926, XCV, p. 367).
- ECKSTEIN (H.-C.) and WILE. — The cholesterol and phospholipid content of the cutaneous epithelium of man. (*Journ. Biol. Chem.*, 1926, LXIX, p. 181).
- EULER (H.-V.), EULER (B.-V.) und RYDBORN. — Vitamin Wirkungen durch Sterylphosphate und durch Sterine der Erythrocyten (*Bioch. Zeit.*, 1928, CIC, p. 276).
- FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Cholestérine, rachitisme et rayons U. V. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCIV, p. 455).
- Les stérols irradiés, propriétés physiques et biologiques (*Ann. Phys. et Chim.*, 1928, IV, p. 531).
- Contribution à l'étude des stérols irradiés (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, IC, p. 193).
- FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude des propriétés physiques et biologiques des stérols irradiés (*Bull. Soc. Chim.*, 1928, X, p. 1100).
- L'irradiation des stérols. Les rapports des stérols irradiés avec la vitamine antirachitique (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1928 (8), VII, p. 489).
- FARRINGTON and FOSBINDER (R.-J.). — Ultra-violet light and the oxydation of cod liver oil (*Science*, 1925, p. 266).
- FOSBINDER, DANIELS et STEENBOCK. — A quantitative study of the photochemical activation of sterols in the cure of rickets (*Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1928, L, p. 923).
- FLORENCE (G.) et ENSELME (J.). — *Actualités biochimiques*, Doin, éditeur.
- GÉRARD (E.). — Sur les cholestérines végétales (*C. R.*, 1892, XCIV, p. 1544).
- Sur les cholestérines des cryptogames (*C. R.*, 1895, CXXI, p. 725).
- Sur les cholestérines des végétaux inférieurs (*C. R.*, 1898, CXXVI, p. 908).
- GRIGAUT. — Le cycle de la cholestérinémie (*Thèse Médecine, Paris*, 1913).

- Du cholestérol aux acides biliaires (*Revue Soc. Chim. Biol.*, t. X, juillet-août 1928, n° 7, p. 937).
- A. GUY. — The history of cod liver oil as a remedy (*Am. J. Dis. Child.*, 1923, pp. 26 et 112.)
- HAMANO. — Photoaktivierung von Vitamin A, Cholesterin, Fetten und anderen Substanzen durch U.V. Strahlen (*Biol. Zeits.*, 1925, 163, p. 438).
- *Id.*, von X Strahlen (*Bioch. Zeits.*, 1926, CLXIX, p. 432).
- HARRIS. — Studies on biological action of light (*Proc. roy. soc.*, 1925, 98, 171).
- Photo-oxydation of plasma (*Bioch. Journ.*, 1926, 20, 280).
- Photo-oxydation of proteins (*Bioch. Journ.*, 1926, 20, 288).
- HART (E.-B.), STEENBOCK and HOPPERT. — Dietary factors influencing calcium assimilation. I. The comparative influence of green and dried plant tissue, cabbage, orange juice and cod liver oil on calcium assimilation (*Journ. Biol. Chem.*, 1921, XLVIII, pp. 35-50).
- HEILBRON (I. M.), KAMM and MORTON. — Absorption bands of ergostérol and Vitamin D. (*Nature*, 1927, CXX, p. 617).
- HENNING, SCHAEFFER. — Untersuchungen über Photoaktivität (*Bioch. Zeit.*, 1926, 177, 109).
- HENRI (V.). — Comparaison de l'action des rayons U. V. sur les organismes avec les réactions photochimiques simples et complexes (*C. R. Soc. Biol.*, 1912, LXXIII, p. 323).
- HESS. — Antirachitic activity of irradiated cholesterol and allied substances (*Journ. Amer. Med. Ass.*, 1927, LXXXVIII, p. 337).
- HESS and ANDERSON (R.-J.). — The antirachitic value of irradiated cholesterol and phytosterol VIII. The activation of sterol fractions by U. V. irradiation (*Journ. Biol. Chem.*, LXXIV, p. 651).
- HESS (A.-F.) and WEINSTOCK. — Antirachitic properties imparted to inert fluids and to green vegetables by U. V. irradiation (*Journ. Biol. Chem.*, 1924, LXII, p. 301).

- HESS et WEINSTOCK. — Puffer fish oil. (*Proced. Soc. exp. Biol. Med.*, 1926, XXIII, p. 407).
- HESS WEINSTOCK and HELMAN. — The antirachitic value of irradiated phytosterol and cholesterol (*Journ. Biol. Chem.*, 1925, LXIII, p. 305).
- HESS and WINDAUS (A.). — Development of market activity in ergosterol following U. V. irradiation (*Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1927, XXIV, p. 369).
- HIEGER (I.). — On the alleged action of X-rays upon cholesterol (*Bioch. Journ.*, 1927, XXI, p. 407).
- HUGOUNENQ (L.). — *Précis de chimie physiologique et pathologique*, Doin, éditeur.
- *Sur l'analyse des cendres de fœtus*.
- HUGOUNENQ (L.) et COUTURE (E.). — Photo-activité des stérols  
C. R., t. 188, janvier 1929, p. 349.  
C. R., t. 188, mars 1929, p. 742.  
C. R., t. 189, juillet 1929, p. 47.
- *Soc. Chimie Biol.* T. XI, n° 8. Septembre 1929.
- HUME (E.-M.), SMITH and SMEDLEY MAC LEAN. — The examination of irradiated zymosterol for the presence of vitamine D. (*Bioch. Journ.*, 1928, XXII, p. 980).
- JENDRASSIK and KEMENYFFY. — Zur Kenntniss des D Vitamins. I Über die Actievarbeit des Cholesterins (*Bioch. Zeit.*, 1927, CLXXXIX, p. 180).
- JOURDAIN et SIMONNET. — *L'ergostérol irradié devant l'expérimentation et la clinique*. Editions Chahine, 1929. Bibliographie très complète.
- KNUDSON (A.) and MOORE. — Caparison of the antirachitic potency of ergosterol irradiated by ultra-violet light and by exposure to cathod rays (*Journ. Biol. Chem.*, 1928, LXXXVIII. *Proceed. Soc. Biol. Chem.*, XIX).
- KON (S.-K.) and MOORE. — Note on the attempted activation of tyrosine by ultra-violet irradiation (*Bioch. Journ.*, 1927, XXI, 1368).
- KRAMER (B.), KRAMER (S.-D.), SHELLING and SHEAR. — Cod liver oil concentraté. Its value as an antirachitic agent when injected subcutaneously (*Journ. Biol. Chem.*, 1927, LXXI, p. 699).

- KUGELMASS and MAC QUARRIE. — Russel effect, not ultra-violet light responsible for changes produced in the photographic plate by antirachitic substances (*Science*, 1925, p. 86).
- KUSTER und HORTH. — Über das Vorkommen von Ergosterin im Rinderblut (*Ber. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1928, LXI, p. 809).
- LEE (S.). — Photoactivitätsstudien. Blutzuckerwirkung ungesättigter Fettsäuren (*Bioch. Zeits.*, 1926, 179, 210).
- LESNE et SIMON. — Nouvelles observations sur le facteur antirachitique de l'huile de foie de morue (*C. R.*, 1926, CLXXXII, p. 1424).
- LESNE et VAGLIANO. — Différenciation de la vitamine A et du facteur antirachitique (*C. R.*, 1923, CLXXVII, p. 711).
- LESNE, VAGLIANO et CHRISTOU. — Contribution à l'étude du rachitisme expérimental chez le rat (*Soc. Path. comparée*, 10 juillet 1923).
- LESNE, TURPIN et ZIZINE. — *De l'influence des radiations lumineuses.*
- LIFSCHÜTZ. — Studien über den Ursprung und die Bildung des Cholesterins.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1907, Bd 50, p. 436.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1907, Bd 53, p. 140.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1909, Bd 63, p. 220.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1914, Bd 91, p. 309.  
*Bioch. Zeit.*, 1913, Bd 52, p. 206.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1914, Bd 92, p. 383.  
*Zeit. f. physiol. chem.*, 1914, Bd 93, p. 209.  
*Biochem. Zeitsch.*, 1917, Bd 83, p. 18.  
*Biochem. Zeitsch.*, 1922, Bd 129, p. 115.  
*Zeitsch. f. physiol. chem.*, 1919, Bd 106, p. 284.  
*Biochem. Zeitsch.*, 1913, Bd 48, p. 373.  
*Biochem. Zeitsch.*, 1913, Bd 54, p. 212.  
*Biochem. Zeitsch.*, 1914, Bd 62, p. 219.  
*Zeitsch. f. physiol. chem.*, 1916, Bd 96, p. 342.  
*Zeitsch. f. physiol. chem.*, 1916, Bd 101, p. 89.  
*Zeitsch. f. physiol. chem.*, 1921, Bd 117, p. 212.  
*Arch. der Pharm.*, 1930, Heft 3, 343, p. 166.
- LOUREIRO (Avellar DE). — Présence d'un ozonide dans un concentré vitaminique d'huile de foie de morue (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, XCVII, p. 878).

- LOUREIRO (Avellar DE). — L'ozone est-il un composant normal de l'huile de foie de morue? (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, XCVII, p. 879).
- LUCAS. — The nature of the action on a photographic plate of sawdust and cholesterol irradiated by a mercury vapour quartz lamp (*Bioch. Journ.*, 1926, XX, p. 23).
- MAC COLLUM, SIMMONDS, BECKER and SHIPLEY. — Studies on experimental rickets (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, LIII, p. 293).
- MACHT, ANDERSON and BELL. — The penetration of U. V. rays into live animal tissues (*Journ. Amer. Med. Ass.*, 1928, XC, p. 161).
- MACHT and HILL. — The effect of U. V., X ray and radium radiations on the phytopharmacological reaction of normal blood (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1924, XXI, p. 290).
- MALMSTRÖM. — *Acta radiologica*, Vol. 4, Fasc. 3, 1925, Nr 19.
- MARFAN et ODIER-DOLLFUS. — Essai de traitement du rachitisme et de la tétanie par l'ergostérol irradié (*Soc. Pédiatrie*, 1928, 131).
- MELLAMBY. — Experimental rickets (*Med. Res. Comm. Spec. Repts. Ser.*, 1921, n° 61).
- MELLAMBY, SURIE and HARRISSON. — The antirachitic effect of ergot. (*Journ. of physiol.*, 1928, LXV, Proceed XXIX).
- MINOVICI. — Contribution à l'étude du cholestérol (*Confér. Bull. soc. Chim. Biol.*, t. IX, n° 10, déc. 1927, p. 1129).
- MORGAN et MAC LEMAN. — Fluorescence des lipoides (*Bioch. Journ.*, 22, 1928, p. 1514).
- MORISSON, PEACOCK and WRIGHT. — The action of X-radiation upon vitamin D in activated ergosterol (*Bioch. Journ.*, 1923, XXII, p. 1138).
- MORTON, HEILBRON and KAMM. — The absorption spectrum of ergosterol in relation to the photosynthetic formation of vitamin D (*Americ. Journ. Chem. Soc.*, 1927, CXXX, p. 2000).
- MOUREU et Ch. DUFRAISSE. — L'autoxydation et les phénomènes catalytiques qui s'y rattachent (*Rapport. Inst. intern. Chim. Solway. Conseil. Chim.*, Bruxelles, 16 avril 1925).

- MOURIQUAND, BERNHEIM et THEOBALT. — Sur le pouvoir anti-rachitique de la lumière de Wood (*C. R.*, 1926, CLXXXII, p. 1490).
- MOURIQUAND, LEULIER, BERNHEIM et SHOEN. — Recherches sur les fixateurs du calcium (*Presse Médic.*, 18 février 1928, p. 209).
- MOURIQUAND, LEULIER et SCHÆN. — Lait irradié et rachitisme (*Le lait*, 1928, p. 82).
- NIEDERHOFF. — Photo-activité de l'huile de foie de morue (*Bioch. Zeit.*, 176, 1926, p. 478).
- NITZESCU, POPOVICIU et DENES GËTZ. — Contribution à l'isolement de la fraction antirachitique du cholestérol irradié (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, IX, p. 126).
- NITZESCU et POPOVICIU. — L'action sur le rachitisme expérimental des fractions de cholestérine irradiée obtenues soit par cristallisation soit par précipitation à l'aide de la digitonine (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, XCIV, p. 1301).
- NITZESCU, POPOVICIU et UNGUREANU. — Sur le rôle de la moelle osseuse dans le rachitisme expérimental (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, XCIX, p. 894).
- PIET-LATANDRIE. — *Algosterine. Sterols. Algues marines.*
- J. PERRIN. — Lumière et réactions chimiques (*Rapport deuxième conseil de la chimie*, Bruxelles, 1925, p. 322).
- POULSSON. — Das fettlösliche Vitamin (*Deutsch. Med. Woch.*, 1926, janv. 6-8).
- RANDOIN et LECOQ. — Valeur antirachitique comparée de quelques huiles d'animaux marins et de l'huile de foie de morue (*Journ. Pharm. et Chim.*, 1928, VII, p. 529).
- REKLING (E.). — Investigations concerning the photo-activity of certain oils with special reference to their effect as antirachitics (*Acta radiologica*, vol. V, fasc. 6, XII-1926, n° 28).
- RICHAUD. — Polymorphisme des cristaux de cholestérol (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, 83-389).
- ROFFO et CORREA. — Action des rayons X sur le cholestérol (*Bol. Inst. Med. exp.*, 1925, n° 5, p. 363).
- ROGER, BINET et VAGLIANO. — Action des graisses du pommou sur la croissance (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, XC, p. 1310).

- ROHMER, WORINGER et ANDERSEN (Mlle). — Le traitement du rachitisme et de la tétanie par l'ergostérol irradié (*Soc. Pédiat.*, 1928, p. 128).
- ROSENHEIM. — Note on the induced fluorescence of ergosterol (*Bioch. Journ.*, 1927, XXI, p. 1325).
- ROSENHEIM and DRUMMOND. — A delicate colour reaction for the presence of vitamin A (*Bioch. Journ.*, 1925, XIX, p. 753).
- ROSENHEIM and WEBSTER. — Rickets and cholesterol, *Lancet*, 1925, I, p. 1025.
- The antirachitic properties of irradiated sterols (*Bioch. Journ.*, 1926, XX, p. 537).
  - The relations of cholesterol to vitamin D (*Bioch. Journ.*, 1927, XXI, p. 389).
  - The photochemical production of vitamin D from ergosterol (*Lancet*, 1927, II, p. 622).
- ROUSSEAU. — Résonance photochimique ou fixation de l'énergie U. V. par certaines substances (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, p. 1009).
- Fixation de l'énergie U. V. par le manganèse (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, p. 1190).
  - Activité photo-chimique de l'air irradié par les rayons U. V. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, 94, p. 26).
  - Action photo-chimique oxydante du cholestérol irradié (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, XCIX, p. 1844).
  - Dosage du pouvoir oxydant des solutions de cholestérol et d'ergostérol irradiés (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, XCIX, p. 1845).
- RUSSEL. — On the action exerted by certain metals and other substances on a photographic plate (*Proc. Roy. Soc. Lond.*, 1897, 61, p. 424).
- On hydrogen peroxide as the active agent in producing pictures on a photographic plate (*Proc. roy. soc. Lond.*, 64, p. 409).
  - The action of resine and allies bodies on a photographic plate in the dark (*Proc. roy. Soc. Lond.*, 80, p. 376).
- SERONO et CRUTO. — Emanations de rayons U. V. de quelques phosphatides organiques après irradiation (*Presse Méd.*, sept. 1928, p. 1156).

- SIMON. — Huile de foie de morue et rachitisme (*Thèse Paris*, 1926).
- SIM KY AY. — Activation des lipoides par les rayons U.V. (*Thèse Leide*, 1927).
- SMEDLEY MAC LEAN. — The isolation of a second sterol from yeast fat. (*Bioch. Journ.*, 1928, XXII, p. 22).
- SMEDLEY MAC LEAN and THOMAS. — The nature of yeast fat. (*Bioch. Journ.*, 1920, XIV, p. 483).
- SMEDLEY MAC LEAN and THOMAS. — Observations of abnormal iodine values, with special reference to the sterols and resins (*Bioch. Journ.*, 1921, XV, p. 319).
- STUTESKY. — Photo-activité du cholestérol (*Bioch. Zeit.*, t. 187, 1927, p. 388).
- STOLKE (Van), DUREUIL et HEUDEBERT. — Condition de formation et de destruction de la vitamine D au cours de l'irradiation de l'ergostérol (*C. R.*, 1928, CLXXXVII, p. 854).
- TAKAHASHI. — *Journ. Chem. Soc. Japan*, 1923, XLIII, p. 828; Anal. in *Physiol. Abstrac.*, 1923, VIII, p. 257).
- TANRET (C.). — Sur un nouveau principe immédiat de l'ergot de seigle, l'ergostérine (*C. R.*, 1889, CVIII, p. 98; *Ann. Chim. et Phys.*, 1890 (6), XX, p. 289).
- Sur l'ergostérine et la fongistérine (*C. R.*, 1908, CXLVII, p. 75; *Ann. Chim. et Phys.*, 1908 (8), XV, p. 313).
- TANRET (G.). — Sur la composition chimique de l'ergot de seigle et l'ergot d'avoine (*C. R.*, 1922, CLXXIV, p. 827).
- Ergostérine irradiée et vitamine D (*Paris Médical*, n° 4, 26 janvier 1929).
- TSUKAMATO. — Transparence de l'eau de mer pour l'ultraviolet lointain (*C. R.*, janvier 1927).
- VALEUR (A.). — Action de l'ozone sur les composés organiques (*Thèse Sciences, Paris*, 1909).
- VOLLMER. — Photoaktivitätsstudien. I. Mit Einwirkung verschiedener Vitaminträger besonders des Lebertrans auf die Photographische Platte (*Bioch. Zeitsch.*, 1926, CLXXII, p. 407).
- *Bioch. Zeits.*, 1926, CLXXIII, p. 389.
- VOLMER und SEREBRIJSKI. — *Bioch. Zeitsch.*, 1926, CLXXVI, p. 84.

- WEBSTER and BOURDILLON. — Notes on the irradiation of ergostérol (*Bioch. Journ.*, 1928, XXII, p. 1223).
- WEST and BISHOP. — The photochemistry of cod liver oil (*Science*, 1925, p. 86).
- WINDAUS. — Sterins und antirachitisches Vitamin (*Chem. Zeits.*, 1927, LI, p. 113).
- WINDAUS und BORGEAUD. — Über die photochemische dehydrierung des Ergosterines (*Liebig's Annalen*, 1928, CDLX, p. 235).
- WINDAUS und BRUNKEN. — Über die photochemische Oxydation des Ergosterines (*Liebig's Annalen*, 1928, CDLX, p. 225).
- WINDAUS und HESS. — Fremd Beimengungen als Ursache des Aktivierbarkeit des Cholesterins durch Bestrahlung (*Nachr. Gesell. Wissen. Goettin*, 1927, CLXXV, 499).
- YODER. — Effect of antirachitic vitamin on the phosphorus, calcium and PH in the intestinal tract. (*Journ. Biol. Chem.*, 1927, LXXIV, p. 321).
- ZUCKER and MATZNER. — On the pharmacological action of the antirachitic principle of cod liver oil (*Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, 1923, XXI, p. 186).
- ZUCKER PAPENHEIMER and BARNETT. — Observations on cod liver oil and rickets (*Proced. Exp. Biol. Med.*, 1922, XIX, p. 167).



## DEUXIÈME THÈSE

---

Propositions données par la Faculté

1° LES OXYDATIONS EN BIOLOGIE

2° LES ETHERS HEXOSE-PHOSPHORIQUES

---

VU ET APPROUVÉ

*Le Doyen de la Faculté  
des Sciences,*

*Membre de l'Institut*

*Signé : V. GRIGNARD.*

LU ET APPROUVÉ

*Les membres du Jury,*

H. CARDOT.

L. HUGOUNENQ.

J. BEAUVERIE.

CL. FROMAGEOT.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Lyon, le 7 mai 1930.

*Le Recteur de l'Académie de Lyon,*

*Signé : JOSEPH GHEUSI.*



## TABLE DES MATIERES

|                       |   |
|-----------------------|---|
| INTRODUCTION. . . . . | 1 |
|-----------------------|---|

### CHAPITRE PREMIER

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| Le cholestérol et ses dérivés. . . . . | 13 |
|----------------------------------------|----|

### CHAPITRE II

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Techniques générales d'extraction et caractères différentiels des stérols. . . . . | 33 |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CHAPITRE III

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Effets photochimiques des stérols. . . . . | 63 |
|--------------------------------------------|----|

### CHAPITRE IV

|                                                        |     |
|--------------------------------------------------------|-----|
| Oxydation des huiles en présence des stérols . . . . . | 97  |
| CONCLUSIONS GÉNÉRALES. . . . .                         | 137 |
| BIBLIOGRAPHIE. . . . .                                 | 141 |





